

Université de Montréal

L'utilisation prophylactique du sildénafil dans la dysfonction endothéliale  
des artères pulmonaires secondaire à la circulation extracorporelle dans un  
modèle porcin.

Par

**Steve Laurendeau, MD**

Département de Chirurgie  
Institut de Cardiologie de Montréal  
Faculté de médecine  
Université de Montréal

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures  
En vue de l'obtention du grade de maître ès sciences biomédicales

Décembre 2006

Université de Montréal  
Faculté des Études Supérieures

© Steve Laurendeau, 2006





## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Ce mémoire intitulé :

L'utilisation prophylactique du sildénafil dans la dysfonction endothéliale des artères pulmonaires secondaire à la circulation extracorporelle dans un modèle porcin.

Présenté par

Steve Laurendeau, MD

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

---

Dr Alain Deschamps  
Président rapporteur

---

Dr Louis P. Perrault  
Directeur de recherche

---

Dr Nicolas Noiseux  
Membre du jury

---

## RÉSUMÉ

La circulation extracorporelle (CEC) est utilisée au quotidien en chirurgie cardiaque. Cependant, cette technique peut être néfaste pour le patient car elle peut entraîner une dysfonction de plusieurs organes, notamment les poumons, en provoquant une dysfonction endothéliale par diminution de la production de monoxyde d'azote (NO). Ceci peut contribuer à une hypertension artérielle pulmonaire, une condition associée à un haut taux de mortalité postopératoire lorsqu'elle engendre une défaillance du cœur droit.

Plusieurs outils thérapeutiques ont été utilisés pour prévenir cette dysfonction endothéliale. Dans notre laboratoire, la milrinone, un inhibiteur de la phosphodiesterase de type III a donné des résultats intéressants. Nous nous sommes maintenant intéressés à essayer le sildénafil, un inhibiteur de la phosphodiesterase de type V ayant un effet vasodilatateur sur la vascularisation pulmonaire en limitant la dégradation du guanosine monophosphate cyclique (GMPc), un second messager de la voie du NO. Cette stratégie permettrait de prévenir la dysfonction endothéliale sans les effets systémiques néfastes comme l'hypotension lorsque le sildénafil est administré en nébulisation.

Chez un modèle porcin, cinq groupes furent comparés : 1- Contrôle; 2- CEC; 3- Sildénafil inhalé avant la CEC; 4- Sildénafil inhalé après la CEC et 5- Sildénafil intraveineux avant la CEC. Après 90 minutes de CEC et 60 minutes de reperfusion, les relaxations dépendantes de l'endothélium d'artères pulmonaires de deuxième ordre à l'acétylcholine (ACh) et à la bradykinine (BK) ont été étudiées en chambres d'organe.

La CEC cause une diminution de la relaxation dépendante de l'endothélium à l'ACh et à la BK. Cette dysfonction endothéliale est prévenue par l'administration de sildénafil, que ce soit de façon intraveineuse ou par nébulisation et que ce soit, dans ce dernier mode d'administration, avant ou après la CEC. Le sildénafil prévient l'augmentation de la pression artérielle pulmonaire moyenne causée par la CEC avec un profil hémodynamique sécuritaire, ne causant ni hypotension artérielle systémique ni

chute du débit cardiaque. Lorsqu'administré par voie intraveineuse ou par inhalation après la CEC, le sildénafil inhalé améliore l'oxygénation.

L'administration après la CEC par inhalation offre de meilleurs résultats du point de vue hémodynamique et de l'oxygénation. Le sildénafil pourrait s'ajouter à notre arsenal thérapeutique dans la prévention et le traitement de l'hypertension pulmonaire post CEC en chirurgie cardiaque.

Mots clés : Circulation extracorporelle, dysfonction endothéliale, sildénafil

## ABSTRACT

Cardiopulmonary bypass (CPB) is used daily to perform cardiac surgery. This technique, however, can cause side effects for the patient, as it can cause a dysfunction of many organs, notably the lungs, by creating an endothelial dysfunction due to a decreased NO production. This can contribute to pulmonary hypertension, a condition associated with a high postoperative mortality rate when associated with right heart failure.

A few modalities have been used to prevent this endothelial dysfunction. In our laboratory, milrinone, a phosphodiesterase inhibitor type III has been used with interesting results. We are now interested in trying sildenafil, a phosphodiesterase inhibitor type V with a vasodilator effect on the pulmonary vasculature by limiting the degradation of cyclic guanosine monophosphate (cGMP), a second messenger of the NO pathway. This strategy could prevent the endothelial dysfunction without systemic adverse events such as hypotension when administered by nebulisation.

In a porcine model, five groups were compared: 1- Control; 2- CPB; 3- Inhaled sildenafil prior to CPB; 4- Inhaled sildenafil after CPB and 5- Intravenous sildenafil prior to CPB. After 90 minutes of CPB and 60 minutes of pulmonary reperfusion, 2<sup>nd</sup> degree pulmonary arteries endothelium-dependent relaxations to ACh and BK were studied in organ chambers.

CPB decreased the amplitude of the endothelium-dependent relaxation to ACh and to BK. This endothelial dysfunction was prevented by administration of sildenafil, both intravenously and by inhalation and for the latter both prior and after CPB. Moreover, sildenafil prevented the increase in pulmonary artery pressure caused by CPB with a safe hemodynamic profile causing no systemic hypotension and decrease in cardiac output. When administered by inhalation after CPB or intravenously, sildenafil improved oxygenation.

In conclusion, the administration by nebulisation after CPB gave better results regarding hemodynamic and oxygenation. Sildenafil could be added to our therapeutic arsenal for the prevention and treatment of pulmonary hypertension after CPB in cardiac surgery.

Key words: Cardiopulmonary bypass, endothelial dysfunction, sildenafil



# TABLES DES MATIÈRES

<b>IDENTIFICATION DES MEMBRES DU JURY .....</b>	<b>ii</b>
<b>RÉSUMÉ.... ..</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>v</b>
<b>TABLES DES MATIÈRES .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTE DES ABBRÉVIATIONS .....</b>	<b>xii</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>xv</b>
<b>CHAPITRE 1 .....</b>	<b>1</b>
<i>INTRODUCTION .....</i>	<i>1</i>
<b>CHAPITRE 2 .....</b>	<b>5</b>
<i>FONCTION DE L'ENDOTHÉLIUM SAIN .....</i>	<i>5</i>
<i>Facteurs relaxants dérivés de l'endothélium .....</i>	<i>8</i>
Monoxyde d'azote .....	8
Prostacycline .....	11
Facteur hyperpolarisant dépendant de l'endothélium (EDHF) .....	12
<i>Facteurs contractants dérivés de l'endothélium .....</i>	<i>14</i>
Endothéline .....	14
Prostanoïdes vasoconstricteurs .....	15
Espèces réactives oxygénées .....	16
Angiotensine II (Ang II) .....	19
<b>CHAPITRE 3 .....</b>	<b>21</b>
<i>LA CIRCULATION EXTRACORPORELLE .....</i>	<i>21</i>
<i>Historique.....</i>	<i>22</i>
<i>Principes de base .....</i>	<i>24</i>
<i>Réponse inflammatoire .....</i>	<i>27</i>
Le complément .....	27
Les neutrophiles .....	29
Les monocytes .....	29
Les cellules endothéliales .....	30
Autres .....	30
<i>Dysfonction endothéliale .....</i>	<i>32</i>
<i>Dysfonction pulmonaire suivant la CEC .....</i>	<i>35</i>
<b>CHAPITRE 4 .....</b>	<b>37</b>

<i>HYPERTENSION ARTÉRIELLE PULMONAIRE</i> .....	37
<b>CHAPITRE 5</b> .....	<b>42</b>
<i>SOLUTIONS À LA DYSFONCTION PULMONAIRE POST CEC</i> .....	42
<i>Sildénafil</i> .....	46
<b>HYPOTHÈSES ET BUTS</b> .....	<b>48</b>
<b>CONTRIBUTION ORIGINALE</b> .....	<b>50</b>
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>82</b>
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>87</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>89</b>

## LISTE DES FIGURES

### Chapitre 2

**Figure 1.** Synthèse, mécanisme d'action et dégradation du NO.

5'-AMP : adénosine monophosphate. ACh : acétylcholine. AMPc : adénosine monophosphate cyclique. ATP : adénosine triphosphate. BK : bradykinine.  $\text{Ca}^{2+}$  : calcium. 5'-GMP : guanosine monophosphate. GMPc : guanosine monophosphate cyclique. GTP : guanosine triphosphate. NOS : monoxyde d'azote synthétase. NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit. NOS : monoxyde d'azote synthétase.  $\text{PGI}_2$  : prostacycline.

### Chapitre 3

**Figure 2.** Les étapes d'activation des voies classique et alternative du complément. Le contact direct du sang hépariné avec la surface synthétique du circuit de CEC active la voie classique. L'activation de C1 active séquentiellement C2 et C4 pour former C4b2a (C3 convertase classique) qui clive C3 pour former C3a et C3b. La génération de C3b active la voie alternative qui implique les facteurs B et D dans la formation de C3bBb. Cette dernière est la C3 convertase de la voie alternative qui clive C3 en C3a et C3b.

### Contribution originale

**Figure 1.** Anneaux d'artères pulmonaires de porc avec endothélium. Axe des X : Log ACh (M). Axe des Y : relaxation (% de la contraction à la PE). PE : phényléphrine. Données exprimées en moyenne  $\pm$  SEM.  $*p < 0.05$  CEC vs contrôle,  $\&p < 0.05$  sildénafil inhalé avant CEC vs CEC,  $\#p < 0.05$  sildénafil inhalé après CEC vs CEC,  $\alpha p < 0.05$  sildénafil iv vs CEC.

**Figure 2.** Anneaux d'artères pulmonaires de porc avec endothélium. Axe des X : Log BK (M). Axe des Y : relaxation (% de la contraction à la PE). PE : phényléphrine. Données exprimées en moyenne  $\pm$  SEM.  $*p < 0.05$  CEC vs contrôle,  $\&p < 0.05$

sildénafil inhalé avant CEC vs CEC, # $p<0.05$  sildénafil inhalé après CEC vs CEC,  $\alpha p<0.05$  sildénafil iv vs CEC.

**Figure 3.** Paramètres hémodynamiques de base et après 30 et 60 minutes de reperfusion : a) pression artérielle pulmonaire moyenne, b) pression artérielle moyenne, c) débit cardiaque et d) gradient alvéolo-artériel en oxygène. Données exprimées en moyenne  $\pm$  SEM. \* $p<0.05$  vs base.

## LISTE DES TABLEAUX

### **Chapitre 4**

**Tableau 1.** Classification clinique de l'HTP. Tiré de McLaughlin et Rich, 2004.

### **Contribution originale**

**Tableau 1.** Réponse contractile à une solution physiologique dépolarisante contenant 60 mM de chlorure de potassium (KCl) et concentration de PE nécessaire pour obtenir 50% de la contraction induite par le KCl d'artères pulmonaires isolées de porcs contrôle (n=6), de porcs ayant subi une CEC seule (n=6), de porcs ayant reçu une inhalation de sildénafil avant la CEC (n=6) ou après la CEC (n=6) et de porcs ayant reçu du sildénafil intraveineux (n=5). Données exprimées en moyenne  $\pm$  SEM.

## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

5'-AMP	Adénosine monophosphate
5'-GMP	Guanosine monophosphate
5-HT	Sérotonine
AaDO <sub>2</sub>	Gradient alvéolo-artériel en oxygène
ACh	Acétylcholine
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
Ang II	Angiotensine II
ARDS	Syndrome de détresse respiratoire aigu (Acute Respiratory Distress Syndrome)
ATP	Adénosine triphosphate
BH <sub>4</sub>	Tétrahydrobioptérine
BK	Bradykinine
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaM	Calmoduline
CaV-1	Cavéoline-1
CE	Cellule endothéliale
CEC	Circulation extracorporelle
Cgmp	Cyclic guanosine monophosphate
CML	Cellules musculaires lisses
CNP	Peptide natriurétique de type C
COX	Cyclooxygénase
CPAP	Pression positive continue (Continuous Positive Airway Pressure)
CPB	Cardiopulmonary bypass
CREST	Calcinosis cutis, Raynaud, dysfonction oEsophagienne, Sclérodactylie, Télangiectasie
ECE	Enzyme de conversion de l'endothéline
EDCF	Facteur contractant dépendant de l'endothélium
EDHF	Facteur hyperpolarisant dépendant de l'endothélium
EDRF	Facteur relaxant dépendant de l'endothélium

eNOS	Monoxyde d'azote synthétase endothéliale
ERO	Espèces réactives oxygénées
ET-1	Endothéline-1
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FMN	Flavine mononucléotide
GC	Guanylate cyclase
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GTP	Guanosine triphosphate
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
HTP	Hypertension artérielle pulmonaire
iNOS	Monoxyde d'azote synthétase inductible
K <sub>Ca</sub>	Canaux potassiques sensibles au Ca <sup>2+</sup>
KCl	Chlorure de potassium
L-NAME	N-nitro-L-arginine
L-NMMA	N-monométhyl-L-arginine
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
nNOS	Monoxyde d'azote synthétase neuronale
NO	Monoxyde d'azote (Nitric Oxide)
NOS	Monoxyde d'azote synthétase
O <sub>2</sub>	Oxygène
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anion superoxyde
OH	Radical hydroxyle
ONOO-	Peroxynitrite
ONOOH	Acide peroxynitrique
PaO <sub>2</sub>	Pression artérielle d'oxygène
PAP	Pression artérielle pulmonaire
PAPm	Pression artérielle pulmonaire moyenne
PE	Phényléphrine
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandine H <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostacycline
SDC	Sevrage difficile de la CEC
SOD	Superoxyde dismutase

TXA<sub>2</sub>

Thromboxane A<sub>2</sub>

V/Q

Ventilation/perfusion



## REMERCIEMENTS

Puisque la réalisation de cette maîtrise eut été impossible sans la collaboration des personnes suivantes, cette section leur rend hommage. Je désire tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Perrault, d'avoir accepté que je me joigne à son équipe. Il fut pour moi un modèle de motivation et un mentor. Ses conseils, ses commentaires et nos discussions m'ont permis de développer ma critique scientifique et mon soucil du détail. Ces outils me seront utiles non seulement dans ma carrière scientifique et médicale mais aussi dans la vie de tous les jours.

Viennent ensuite mes collègues du laboratoire. Marie-Pierre, sans qui j'aurais sûrement fini bien tard tous les soirs et pris 3 ans de plus pour finir ma maîtrise. Ta compétence et ton dévouement n'ont d'égal que tes compétences de réceptionniste, surtout quand tu réponds au Dr Cartier au téléphone. Redonne-moi des nouvelles pour la soirée de cabane à sucre 2010. Marie-Claude, bien que tu sois détentrice du top 3 au palmarès de la honte, ton dévouement et ton jugement te mèneront sûrement très loin dans ta carrière scientifique. Merci d'avoir toujours été disponible, que ce soit pour terminer mes chambres d'organe ou pour m'aider à trouver de la corde. N'oublie pas, si un jour tu as des enfants, ne laisse pas de lacet à leur portée. Comme ils se mettent tout dans la bouche, tu ne voudrais pas qu'ils développent une sténose aortique. Olivier, bien qu'il soit fort probable que tu ne liras jamais ces lignes, je dois te remercier pour tes conseils techniques, ton aide et tes discussions. Grâce à toi, je sais maintenant ce que sont les tartiflettes. À Émilie, qui est arrivée vers la fin de mon année au laboratoire.

## **CHAPITRE 1**

### **INTRODUCTION**

La CEC est utilisée au quotidien en chirurgie cardiaque à travers le monde et ce depuis des dizaines d'années. Cette dernière permet au chirurgien de travailler sur un cœur immobilisé en diastole et dans un champ opératoire exsangue. La CEC n'est cependant pas sans effets secondaires pour le patient et des altérations physiologiques ont été reconnues dès les premières années de son utilisation dans les années 1950. La CEC déclenche chez le patient une réponse inflammatoire systémique entraînant une dysfonction de plusieurs organes, notamment les poumons. Durant la CEC, le sang est dévié de l'oreillette droite vers l'aorte. Les poumons ne sont alors perfusés que par les artères bronchiques et subissent alors une période ischémique. Lorsque la CEC est sevrée, les poumons sont alors reperfusés. Ce cycle d'ischémie-reperfusion entraîne la production et l'exposition des poumons à des radicaux libres. De plus, l'activation des neutrophiles et des plaquettes ajoute des insultes additionnelles aux poumons. Ce poumon pathologique est caractérisé par une augmentation de la perméabilité capillaire pulmonaire entraînant une diminution de l'oxygénation manifestée par une augmentation du gradient alvéolo-artériel en oxygène ( $AaDO_2$ ) associée à une diminution de la compliance et une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires (*Kolff et al.*, 1958). Après la CEC, une dysfonction endothéliale pulmonaire survient (*Wan et al.*, 1997) et peut contribuer à la survenue d'une hypertension pulmonaire. Lorsque cette hypertension pulmonaire est associée à une défaillance du cœur droit, le pronostic s'assombrit nettement et le taux de mortalité périopératoire peut alors atteindre 44 à 86% (*Davila-Roman et al.*, 1995). Un autre point important à noter est que l'HTP est associée à un sevrage difficile de la CEC (SDC) (*Robitaille et al.*, 2006). Le SDC est un important facteur prédictif du résultat en chirurgie cardiaque et est associé avec une augmentation du taux de mortalité due à des complications hémodynamiques (*Robitaille et al.*, 2006 ; *Denault et al.*, 2006). Au Canada l'année dernière, il s'est fait 36 000 chirurgies cardiaques et près de 50% des chirurgies ayant nécessité la CEC nécessiteront un support vasoactif pour sortir de CEC et donc pourrait être associé à un SDC. Il est également important de noter le nombre croissant de chirurgies cardiaques complexes et la population vieillissante, laissant présager une augmentation du taux de SDC. La prévention du SDC pourrait donc avoir un impact important non seulement sur les résultats chirurgicaux et aussi sur les finances du système de santé.

L'endothélium intact joue plusieurs rôles importants en régularisant le tonus vasculaire et en inhibant l'aggrégation des plaquettes et l'adhésion des neutrophiles. Il remplit ces fonctions par la sécrétion de facteurs vasorelaxants et vasocontractants. La description des différents facteurs de ces deux classes se fera dans le chapitre suivant. La dysfonction endothéliale peut être définie comme un déséquilibre entre facteurs relaxants et facteurs contractants résultant en une perte du rôle protecteur normal de l'endothélium sur l'homéostasie de la paroi vasculaire (*Chen et al.*, 2000).

En situation clinique, plusieurs agents pharmacologiques ont été utilisés pour le traitement de l'hypertension pulmonaire et la prévention de la défaillance du cœur droit après une chirurgie cardiaque sous CEC. Ces modalités incluent des agents comme la milrinone intraveineuse ou inhalée, la nitroglycérine intraveineuse, le NO inhalé, la prostacycline (PGI<sub>2</sub>) et ses analogues et les assistances ventriculaires. Cependant, aucun de ces médicaments n'est approuvé par la FDA et Santé Canada pour cette indication. Le plus souvent utilisé en clinique demeure la milrinone intraveineuse.

La milrinone est un inhibiteur de la phosphodiesterase de type III qui augmente le niveau intracellulaire d'AMPc en limitant sa dégradation. Dans une étude expérimentale précédente, l'administration intraveineuse de milrinone entraînait une chute des résistances vasculaires systémiques causant une hypotension (*Lamarche et al.*, 2005). Ce phénomène est également observé en clinique. Ces instabilités hémodynamiques ne sont pas souhaitables après une chirurgie cardiaque et nécessitent l'ajout d'un support pharmacologique vasopresseur. De plus, lorsqu'administrée de façon intraveineuse, la milrinone ne prévient pas la dysfonction endothéliale pulmonaire et est associée à une augmentation du AaDO<sub>2</sub> après 60 minutes de reperfusion ( $p < 0.05$ ). Dans la même étude, l'administration par inhalation de milrinone a prévenu les altérations de relaxation des artères pulmonaires à l'ACh causées par la CEC et amélioré la relaxation à la BK. Cependant, aucun effet positif sur la pression artérielle pulmonaire ou sur les résistances vasculaires pulmonaires n'a pu être démontré. Des essais cliniques sont présentement en

cours pour étudier l'effet de ce mode d'administration sur des patients ayant subi une chirurgie cardiaque.

Le sildénafil est un inhibiteur de la phosphodiesterase de type V utilisé principalement dans le traitement de la dysfonction érectile. La phosphodiesterase de type V inactive la GMPc synthétisée par la guanylate cyclase (GC) après stimulation par le NO au niveau du muscle lisse vasculaire. En inhibant la phosphodiesterase, le sildénafil limite donc le métabolisme du produit final de la voie du NO, favorisant son effet vasodilatateur. Ce type de phosphodiesterase est retrouvé dans peu de tissus (poumon, plaquette, muscle lisse) et semble donc plus spécifique pour l'effet recherché (*Raja et al.*, 2004).

## **CHAPITRE 2**

### **FONCTIONS DE L'ENDOTHÉLIUM SAIN**

La première référence à l'endothélium nous provient de Malphigi au 17<sup>e</sup> siècle. Von Recklinghausen, au 19<sup>e</sup> siècle, en fit une description plus détaillée. Cette couche cellulaire tapisse l'intérieur de la paroi vasculaire. Initialement, le seul rôle qu'on lui attribuait était celui d'une barrière physique entre le compartiment intravasculaire et le compartiment extravasculaire. Nous savons aujourd'hui qu'il en est tout autrement.

Sa situation entre le sang et les cellules musculaires lisses (CML) de la paroi vasculaire (*Schiffrin EL*, 1994) lui permet de remplir plusieurs rôles. La perméabilité sélective lui permet de contrôler le transport des solutés, cellules et macromolécules à travers la paroi vasculaire (*Flavahan et Vanhoutte*, 1995 ; *Vanhoutte et al*, 1997). L'endothélium participe également à la régulation des niveaux de ces facteurs.

L'endothélium maintient une surface non thrombogénique en inhibant l'adhésion et l'extravasation des cellules pro-inflammatoires à savoir les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes (*Fishman AP*, 1982; *Schiffrin EL*, 1994; *Boulanger et Vanhoutte*, 1997; *Rubanyi GM*, 1993). Il possède également une action anti-plaquettaire (synthèse de NO et de PGI<sub>2</sub>), anti-coagulante (expression de glycosaminoglycans et de thrombomoduline) et fibrinolytique (libération de l'activateur du plasminogène tissulaire).

Une autre fonction des cellules endothéliales (CE), celle qui est au coeur de cette étude, est l'influence qu'elles exercent sur les CML. En effet, elles modulent la contraction, la croissance et la migration de ces dernières (*Rubanyi GM*, 1993 ; *Mombouli et Vanhoutte*, 1999). Plusieurs stimuli physiques, telle que les forces de cisaillement, et chimiques vont activer les CE. Ces substances sont soit générées de façon systémique ou bien localement, par le tissu vasculaire ou les cellules circulantes. Elles proviennent des sites suivants :

- système nerveux autonome : ACh, adénosine triphosphate (ATP), substance P, norépinéphrine

- des hormones circulantes : épinéphrine, vasopressine, angiotensine II (Ang II), insuline
- des dérivés de la coagulation et des produits plaquettaires : sérotonine (5-HT), adénosine diphosphate (ADP), thrombine
- des CE et des CML : BK, ADP/ATP, angiotensines, histamine et endothéline-1 (ET-1)

Dans l'état non pathologique, les facteurs relaxants dépendants de l'endothélium (EDRFs) prédominent sur les facteurs contractants dépendants de l'endothélium (EDCFs), favorisant ainsi la relaxation vasculaire (*Boulanger et Vanhoutte, 1997*). Les principaux facteurs relaxants et contractants seront discutés plus en détails dans la section suivante. Finalement, les CE sont également impliquées dans le processus d'angiogenèse par la sécrétion de NO, ce dernier étant essentiel, du moins dans la circulation pulmonaire foetale (*Balasubramaniam et al., 2006*).

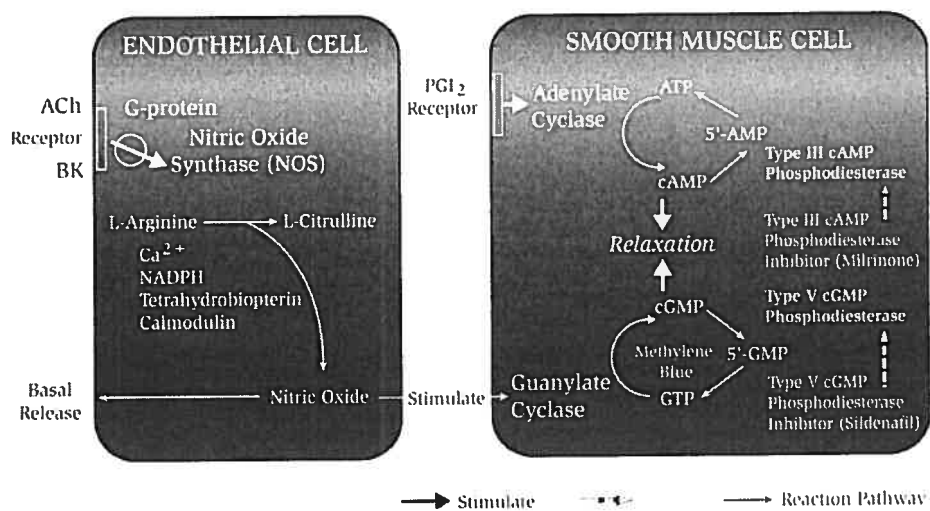


## FACTEURS RELAXANTS DÉPENDANT DE L'ENDOTHÉLIUM

### Monoxyde d'azote

Le principal EDRF fut découvert en 1980 suite à une stimulation des CE par l'ACh (*Furchgott et Zawadzki*, 1980) mais ne fut identifié que près de deux décennies plus tard comme étant le NO, découverte ayant procuré le prix Nobel de Médecine de 1998 aux Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro et Ferid Murad. Ce radical libre non prostanoïde est une substance diffusible possédant une demi-vie de quelques secondes (*Martin et al.*, 1985). Sa contribution est surtout prédominante dans les artères de grand calibre i.e. coronaires, systémiques, cérébrales, mésentériques et pulmonaires (*Vanhoutte et al.*, 1997).

La synthèse du NO fut éclaircie il y a de cela moins d'une décennie (*Palmer et al.*, 1998) et est illustrée à la figure 1. Le précurseur, la L-arginine, est scindé en NO et en L-citrulline par l'enzyme monoxyde d'azote synthétase (NOS). Deux analogues de la L-arginine, le N-nomométhyl-L-arginine (L-NMMA) et la N-nitro-L-arginine (L-NAME) peuvent inhiber l'enzyme.



**FIGURE 1.** Synthèse, mécanisme d'action et dégradation du NO.

La NOS est en fait une famille d'enzymes dont trois sous-types ont été identifiés. La première forme caractérisée est l'isoforme inducible, la iNOS (*Bredt et al.*, 1991). Indépendante du  $\text{Ca}^{2+}$ , elle peut être exprimée au niveau des cellules inflammatoires infiltrantes, des CE des microvaisseaux coronaires et de l'endocarde, des CML vasculaires et des fibroblastes (*Schulz et al.*, 1992 ; *Smith et al.*, 1993 ; *Shindo et al.*, 1994; *Balligand et al.*, 1994; *Balligand et al.*, 1995) suite à une stimulation par des médiateurs inflammatoires tels les cytokines et les lipopolysaccharides (*Berges et al.*, 2003).

Les deux autres sous-types sont exprimés constitutivement et régulés par la présence de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique. La NOS neuronale (nNOS), qui fut d'abord identifiée dans le tissu nerveux, se retrouve dans les neurones, les cellules ganglionnaires et dans les tissus de conduction (*Andries et al.*, 1998). La NOS endothéliale (eNOS) est exprimée dans l'endothélium au niveau du système cardiovasculaire (*Ursell et Mayes*, 1995). Bien que la CE contienne constitutivement la eNOS, la production de NO ne se fait qu'après une cascade d'activation déclenchée par des facteurs physiques ou chimiques.

L'activation de la eNOS se fait suite à une augmentation des forces de cisaillement, provoquée par l'onde de pulsation, l'exercice physique, l'hypoxie chronique et l'insuffisance cardiaque (*Kone*, 1999). Une variété de substances endogènes peuvent entraîner la libération de NO tels que des hormones circulantes (cathécholamines, vasopressine), des autacoïdes générés au niveau de la paroi vasculaire (BK, histamine), des médiateurs produits par les plaquettes (sérotonine, ADP) ou formés lors de la coagulation (thrombine) (*Lüscher et Vanhoutte*, 1990; *Furchgott et Vanhoutte*, 1989; *Vanhoutte*, 1988; *Vanhoutte*, 1993; *Vanhoutte et Boulanger*, 1995; *Vanhoutte et Scott-Burden*, 1994; *Vanhoutte et Shimokawa*, 1989; *Vanhoutte et al.*, 1992; *Vanhoutte*, 1991; *Vanhoutte*, 1989; *Vanhoutte et al.*, 1995; *Vanhoutte*, 1996). Ces substances interagissent avec des récepteurs à la surface des CE. Ces récepteurs sont couplés aux protéines  $G_i$  (récepteurs 5-HT<sub>1D</sub>, ET<sub>B</sub>,  $\alpha_2$ -adrénergique) sensibles à la toxine de coqueluche ou aux protéines  $G_q$  (récepteurs des kinines et purinergiques). Le résultat

est une augmentation de la concentration cytosolique de  $\text{Ca}^{2+}$  (*Boulanger et Vanhoutte*, 1997). Cette augmentation permet alors à la NOS (endothéliale et neuronale) de se lier à la calmoduline (CaM). La liaison du complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM active la eNOS et lui permet de se dissocier de la cavéoline-1 (CaV-1) qui exerce une régulation négative. Une fois que la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  retourne à la normale, la liaison eNOS/CaV-1 reprend et le complexe retourne dans les cavéoles (*Feron et al.*, 1998). L'activation de la eNOS nécessite également la présence de cofacteurs : oxygène ( $\text{O}_2$ ), NADPH, flavine adénine dinucléotide (FAD), flavine mononucléotide (FMN) et la  $\text{BH}_4$  (*Boulanger et Vanhoutte*, 1997). En plus d'agir comme cofacteur, la  $\text{BH}_4$  est requise pour le maintien de la stabilité structurelle et fonctionnelle de l'enzyme (*Shah et MacCarthy*, 2000).

Le NO remplit majoritairement son rôle au niveau de la CML qu'il atteint par diffusion à travers la bicouche lipidique sans la participation d'une protéine membranaire. L'action du NO implique la stimulation de la GC. Cette dernière forme du GMPc à partir du GTP (*Rapoport et Murad*, 1983) qui active une protéine kinase dépendante du GMPc. Cette protéine kinase mènera à l'inhibition de l'appareil contractile en augmentant la sortie de calcium du cytosol des CML, la capture de calcium dans les réservoirs intracellulaires et la déphosphorylation de la chaîne légère de la myosine (*Küng et Lüscher*, 1995 ; *Küng et al.*, 1995) et en phosphorylant les canaux potassiques pour induire une hyperpolarisation (*Lincoln et al.*, 1994).

Le NO joue également d'autres rôles au niveau du muscle lisse vasculaire sous-jacent en inhibant également la prolifération et la migration des CML (*Scott-Burden et Vanhoutte*, 1993 ; *Scott-Burden et Vanhoutte*, 1994). Les CE sécrètent également le NO dans la lumière du vaisseau sanguin. Puisque la présence d'oxyhémoglobine neutralise immédiatement le NO, l'effet dans la circulation survient à l'interface entre les cellules endothéliales et le sang. Au niveau de la circulation sanguine, il est responsable de l'inhibition de l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (*Vanhoutte et al.*, 1997). L'augmentation de GMPc est associée à une diminution de l'adhésion et de l'agrégation des plaquettes (*Ruschitzka et al.*, 1997). Finalement, il inhibe la synthèse d'endothéline

et l'expression des molécules d'adhésion à la surface de l'endothélium (*Vanhoutte et al.*, 1997).

### **Prostacycline**

Ce prostanoïde vasodilatateur est produit suite à l'activation, dans l'ordre chronologique, de la phospholipase A<sub>2</sub>, de la cyclooxygénase (COX) et de la prostacycline synthétase. Cette cascade enzymatique survient suite à une stimulation endothéliale (forces de cisaillement, hypoxie et autres médiateurs communs au NO) (*Vanhoutte et al.*, 1997) et est dépendante d'une augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire (*Parsaee et al.*, 1992 ; *White et Martin*, 1989). La PGI<sub>2</sub> est générée de manière prédominante au niveau des CE (*Eldor et al.*, 1981) et de façon moindre dans la média et l'adventice (*Moncada et Vane*, 1979). Cette différence est due à la plus grande disponibilité du précurseur de la PGI<sub>2</sub>, le PGH<sub>2</sub>, alors que les concentrations de PGI<sub>2</sub> synthétase sont identiques dans les CE et CML (*De Witt et al.*, 1983).

L'action de la prostacycline dépend de la participation d'un récepteur spécifique, ce qui procure une certaine sélectivité à ce dérivé de l'acide arachidonique aux lits vasculaires qui expriment ce récepteur (*Halushka et al.*, 1989 ; *Coleman et al.*, 1994). Ce dernier est couplé à l'adénylate cyclase, une enzyme responsable de la conversion de l'ATP en AMPc (*Kukovetz et al.*, 1979) (figure 1). Ce second messenger agit de deux façons. Premièrement en ouvrant les canaux potassiques sensibles à l'ATP (*Ribalet et al.*, 1989), entraînant ainsi une hyperpolarisation de la membrane et une relaxation subséquente du muscle lisse vasculaire. Deuxièmement, en étant responsable de la sortie du Ca<sup>2+</sup> du cytosol des CML, inhibant ainsi la machine contractile (*Bukoski et al.*, 1989 ; *Abe et Karami*, 1992). Dans la plupart des vaisseaux sanguins, la contribution de la prostacycline aux relaxations dépendantes de l'endothélium est négligeable et son effet est essentiellement synergique à celui du NO. En fait, les deux actions prédominantes de la PGI<sub>2</sub> sont l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, en synergie avec le NO (*Radomski et al.*, 1987) et la stimulation de la libération de NO des CE (*Shimokawa et al.*, 1988). Par ailleurs, le NO potentialise l'action de la PGI<sub>2</sub> dans les

CML (*Delpy et al.*, 1996) puisque l'augmentation du GMPc dans les CML inhibe la phosphodiesterase III qui dégrade l'AMPc (*Weigert et al.*, 1994).

### **EDHF**

Des études électrophysiologiques dans des artères de calibre moyen et de résistance ont montré que la relaxation dépendante de l'endothélium était aussi présente suite à une inhibition de la synthèse du NO et de la prostacycline (*Feletou et Vanhoutte*, 1996). Cette relaxation est accompagnée d'une hyperpolarisation de la membrane cellulaire du muscle lisse vasculaire. Bien que le facteur responsable n'est toujours pas identifié, plusieurs hypothèses ont été suggérées : les ions potassiques (hypothèse du nuage de potassium) (*Busse et al.*, 2002), l'acide époxyéicosatriénoïque (11,12-EET ; un métabolite du cytochrome P450 2C8/9) (*Fisshaler et al.*, 1999), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) (*McGuire et al.*, 2001 ; *Campbell et Gauthier*, 2002), le peptide natriurétique de type C (CNP) (*Chauhan et al.*, 2003), ainsi que les S-nitrosothiols (*Batenburg et al.*, 2004). Tous ces facteurs peuvent participer à la modulation des jonctions hétérocellulaires, favorisant ainsi la transmission d'une hyperpolarisation dépendante de l'endothélium vers les CML sous-jacentes (*Sadow SL*, 2004).

Les bases moléculaires de cette relaxation semblent varier selon le lit vasculaire étudié, l'espèce, la race, le sexe et durant le développement, le vieillissement et la maladie (*McGuire et al.*, 2001 ; *Campbell et Gauthier*, 2002 ; *Ding et Triggle*, 2003). Cependant, il est établi que son action est dépendante de la libération de  $Ca^{2+}$  intracellulaire. Comme pour le NO, un stimulus physique ou chimique entraîne une augmentation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire dans les CE (*McGuire et al.*, 2001 ; *Griffith TM*, 2004 ; *Ellis et Triggle*, 2004). Il en résulte une activation des canaux potassiques sensibles au  $Ca^{++}$  ( $K_{Ca}$ ) localisés au niveau des CE (*McGuire et al.*, 2001). Cette activation des canaux conduit à l'hyperpolarisation de l'endothélium, ensuite transmise aux CML sous-jacentes par des jonctions hétérocellulaires (*McGuire et al.*, 2001). Cette augmentation intracellulaire calcique pourrait également mener à la libération d'un

EDHF, transmis vers les CML par un mécanisme de diffusion (*Campbell et Gauthier, 2002*).

La contribution de l'hyperpolarisation aux relaxations dépendantes de l'endothélium varie selon le diamètre des artères (*Nagao et al., 1992*) et elle semble être plus marquée au niveau des artères de résistance. Dans les vaisseaux de conductance, le rôle du NO prédomine lors de conditions normales. Cependant, lorsque la synthèse de NO y est inhibée, l'EDHF a la capacité d'induire des relaxations pratiquement normales (*Komozi et Vanhoutte, 1990*).

## FACTEURS CONTRACTANT DÉPENDANT DE L'ENDOTHÉLIUM

En condition normale, il existe une nette prédominance de la libération basale des EDRFs alors que les EDCFs n'apportent qu'une contribution mineure, favorisant ainsi la relaxation vasculaire (*Boulanger et Vanhoutte*, 1997). Cependant, dans certaines circonstances, l'endothélium peut initier une vasoconstriction par la libération de substances diffusibles (*De Mey et Vanhoutte*, 1982 ; *Lüscher et Vanhoutte*, 1992 ; *Rubanyi et Vanhoutte*, 1985 ; *Vanhoutte et al*, 1986). Les contractions dépendantes de l'endothélium peuvent s'expliquer soit par le retrait des EDRFs, soit par la production des EDCFs. Les stimuli pour la vasoconstriction dépendante de l'endothélium incluent l'hypoxie, les stimuli physiques tels la pression et l'étirement ainsi que de nombreux médiateurs neurohumoraux.

### Endothéline

La famille des endothélines comporte trois isoformes : ET-1, ET-2 et ET-3. Chaque isoforme est le produit d'un gène différent. Un seul isoforme est synthétisé par l'endothélium, ET-1. Ce peptide de 21 acides aminés provoque une puissante vasoconstriction et fut isolé pour la première fois en 1988 à partir d'aortes de porc (*Yanagisawa et al.*, 1988). Sa synthèse est stimulée par l'hypoxie, la thrombine, l'interleukine-1, les facteurs de croissance, l'Ang II, les produits plaquettaires, la vasopressine et les catécholamines. La première étape de sa synthèse est la génération de son précurseur, la pré-pro-ET, qui est par la suite convertie en big-ET par des endopeptidases. La conversion de la big-ET en un peptide mature par l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) est nécessaire pour le développement d'une activité vasculaire (*Levin*, 1995).

Deux récepteurs de l'ET-1, couplés aux protéines G, ont été identifiés : ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>. Les récepteurs ET<sub>B</sub> sont exprimés à la surface endothéliale et sont impliqués dans la formation de NO et de PGI<sub>2</sub>. L'ET-1 peut donc induire une vasodilatation à de faibles concentrations. Cette induction de la relaxation est contrebalancée à de hautes concentrations tissulaires, par la stimulation des deux sous-types de récepteur sur les CML et par l'accumulation musculaire subséquente de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire (*Lüscher et Barton, 1997*). La production relativement lente d'ET-1 suggère une implication dans la régulation du tonus vasculaire à long terme. En plus de cet effet vasoactif, la liaison de l'ET-1 aux récepteurs des CML est responsable de la prolifération de ces cellules par l'action de la protéine kinase C (*Hirata et al., 1989*).

Le ratio ET<sub>A</sub>:ET<sub>B</sub> dans les artères pulmonaires étant de 9:1 (*Fissthaller et al., 1995*), l'effet de l'ET-1 sur les vaisseaux pulmonaires est une vasoconstriction. L'ET-1 semble jouer un rôle dans l'hypertension pulmonaire (HTP) puisque sa concentration est augmentée de façon proportionnelle au degré d'HTP et les poumons sont des sites producteurs importants d'ET-1 dans cette pathologie. De plus, la stimulation des ET<sub>A</sub> au niveau des artères pulmonaires cause une prolifération des CML (*Dupuis, 2000*).

### **Prostanoïdes vasoconstricteurs**

Deux prostanoïdes vasoconstricteurs sont synthétisés au niveau de l'endothélium, la thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) et la prostaglandine H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>). La PGH<sub>2</sub>, précurseur de tous les prostanoïdes, est synthétisée à partir de l'acide arachidonique suite à l'action de la COX-1 (constitutive) et de la COX-2 (induite). Pour sa part, la thromboxane synthétase métabolise la prostaglandine en TXA<sub>2</sub>. Cette voie est active principalement au niveau des plaquettes et de façon moindre au niveau des CE (*Moncada et Vane, 1979*).

Ces deux prostanoïdes induisent une vasoconstriction en se liant à des récepteurs à la thromboxane et aux endoperoxydes. Cette liaison entraîne une diminution de la



concentration intracellulaire d'AMPc, antagonisant l'action vasodilatatrice de la PGI<sub>2</sub> (Halushka *et al.*, 1989). À l'état non pathologique, la COX synthétise principalement la prostacycline (Moncada *et Vane*, 1979). Les prostanoïdes vasoconstricteurs ont donc peu d'impact en physiologie normale. Finalement, la thromboxane cause une augmentation de l'agrégation plaquettaire et son rôle semble prédominant lors d'hémorragies où la vasoconstriction et l'agrégation plaquettaire constituent la phase primaire de la coagulation.

### **Espèces réactives oxygénées (ERO)**

Dans un état aérobique normal, l'oxygène subit une série de processus d'oxydation (retrait d'un électron) et de réduction (ajout d'un électron) menant à la production d'eau (Kodja *et Harrison*, 1999). Au cours de cette chaîne de réactions enzymatiques, certains d'intermédiaires appelés ERO sont formés. En conditions physiologiques normales, ces molécules sont présentes à de faibles concentrations, étant hautement contrôlées par des systèmes antioxydants, enzymatiques ou non-enzymatiques (Berges *et al.*, 2003). En condition pathologique, un stress oxydant survient lorsque les concentrations des ERO générées surpassent la capacité de neutralisation des systèmes antioxydants.

Les principales sources enzymatiques des ERO sont localisées au niveau de la mitochondrie (cytochromes de la chaîne respiratoire et monoamines oxydases mitochondriales) ou dans les différentes couches constituant la paroi vasculaire (xanthine oxydase, NOS et NAD(P)H oxydase). Des sources additionnelles mais minoritaires de ERO sont le système leucocytaire et les enzymes impliquées dans le métabolisme de l'acide arachidonique telles la COX, la PGH<sub>2</sub> synthétase et la lipoxgénase (Kukreja *et al.*, 1986). Les macrophages et les neutrophiles utilisent la production des ERO pour la défense de l'hôte. Ils génèrent et libèrent de grandes quantités toxiques d'anions superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> via des myéloperoxydases en réponse aux organismes envahisseurs (McGafferty DM, 2000).

Il existe plusieurs ERO. L' $O_2^-$  est formé au niveau de toutes les couches de la paroi vasculaire (*Griendling et al.*, 1994 ; *Touyz et Schiffrin*, 1999 ; *Pagano et al.*, 1997 ; *Rueckschloss et al.*, 2002) et il constitue le précurseur commun des autres ERO. Il est formé par une oxydase liée à la membrane qui utilise le NADH ou le NADPH comme donneur d'un électron à l'oxygène moléculaire (*Mohazzab et al.*, 1994). Sa charge négative lui conférant une solubilité lipidique très limitée, il agit localement où il est généré (*Cai et al.*, 2003). Le  $O_2^-$  est une molécule très instable qui est convertie en l'espace de quelques nanosecondes en  $H_2O_2$  par l'enzyme antioxydante superoxyde dismutase (SOD) ou en peroxynitrite ( $ONOO^-$ ) suite à une interaction avec le NO. En condition physiologique, la réaction prédominante est l'inactivation par la SOD. En condition pathologique, le NO et le  $O_2^-$  peuvent être en excès et une quantité significative de  $O_2^-$  peut être utilisée pour générer le puissant oxydant  $ONOO^-$  (*Hayashi et al.*, 2001). En condition physiologique, le  $H_2O_2$  provient majoritairement de la réaction de catalyse de  $O_2^-$  par la SOD lorsque la concentration de  $O_2^-$  est faible et celle de la SOD normale c'est-à-dire élevée. Il peut également être généré spontanément par la xanthine oxydase (XO) et la glucose oxydase (*Cai et al.*, 2003). Étant non chargé, le  $H_2O_2$  peut diffuser d'une cellule à l'autre et initier des événements spécifiques de signalisation (*Cai et al.*, 2003). Il peut être neutralisé par deux systèmes enzymatiques distincts, la catalase et la glutathion peroxydase. Ces deux systèmes le convertissent en eau. Le  $ONOO^-$  provient de la réaction extrêmement rapide ( $6,7 \times 10^{-9}$  ·M/sec) de deux radicaux, le NO et le  $O_2^-$  (*Goldstein et Czapski*, 1995). À pH physiologique, le  $ONOO^-$  peut gagner un proton pour former l'acide peroxynitrique ( $ONOOH$ ). Le  $ONOO^-$  exerce ses effets par 3 types de réaction : premièrement, suite au clivage homolytique de  $ONOOH$  et par la génération de puissants oxydants ; deuxièmement en réagissant avec le dioxyde de carbone pour former davantage de radicaux libres nocifs (*Squadrito et Pryor*, 1998) ; finalement en agissant directement au niveau de ses cibles. Le  $ONOO^-$  peut avoir des effets bénéfiques lorsque généré par les neutrophiles, les macrophages et les cellules infectées lors de la défense de l'hôte contre une invasion bactérienne (*McGafferty DM*, 2000). Cependant, le  $ONOO^-$  est reconnu principalement pour son puissant pouvoir oxydant, caractéristique associée à des effets délétères lorsqu'il est en concentration élevée. Au niveau vasculaire, il possède une action importante au niveau

de la régulation du tonus vasculaire. Il est en effet responsable de l'oxydation de la  $\text{BH}_4$ , un cofacteur nécessaire pour l'activité de la eNOS (Milstien et Katusic, 1999). Il en résulte donc une diminution de la relaxation dépendante de l'endothélium ainsi qu'une augmentation de l'agrégation plaquettaire et de la prolifération des CML vasculaires (White *et al.*, 1994). Le  $\text{ONOO}^-$  inactive aussi la prostacycline synthétase, diminuant la vasorelaxation par ce mécanisme (Zou *et al.*, 1997 ; Zou *et al.*, 2002). Finalement, puisque la  $\text{PGH}_2$  n'est pas métabolisée en  $\text{PGI}_2$ , cette dernière peut agir au niveau des CML et produire une augmentation de la vasoconstriction (Hink *et al.*, 2003). Heureusement, la réaction entre le  $\text{O}_2^-$  et le NO en condition physiologique n'induit pas la formation d'une quantité suffisante de  $\text{ONOO}^-$  pour exercer un effet significatif au niveau vasculaire. Cependant, en condition de stress oxydatif (hypertension, hypercholestérolémie et reperfusion suite à une ischémie), des quantités supérieures de  $\text{O}_2^-$  et de NO sont générées, favorisant ainsi la production significative de  $\text{ONOO}^-$  et l'induction des effets oxydatifs ci-haut mentionnés (Ronson *et al.*, 1999). Le radical hydroxyl (OH) est une molécule extrêmement réactive et hautement instable. Il est formé à partir de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En condition physiologique, il est produit en quantité négligeable (Josephson *et al.*, 1991). Par contre, lors d'états pathologiques, il est généré significativement lorsque les deux substrats sont présents en grande quantité. Au niveau vasculaire, il peut catalyser la production de prostanoïdes vasoconstricteurs (Auch-Schwelk *et al.*, 1989).

Le statut oxydatif est contrôlé par des antioxydants endogènes de deux types. Parmi les antioxydants enzymatiques, nous retrouvons la SOD, la glutathion peroxydase et la catalase. Dans le groupe non enzymatique, nous retrouvons l' $\alpha$ -tocophérol (vitamine E), l'acide ascorbique (vitamine C), la caroténoïde ( $\beta$ -carotène), la flavonoïde, la bilirubine, l'acide urique et le glutathion (Flavahan et Vanhoutte, 1995).

Lorsque les ERO sont générées en grande quantité et qu'elles échappent au contrôle des antioxydants endogènes, elles ont une action sur le tonus vasomoteur. Au niveau des CML, elles stimulent la production de vasoconstricteurs tels les endoperoxydes et les prostanoïdes. Au niveau endothélial, elles affectent la

biodisponibilité du NO diminuant ainsi les relaxations dépendantes de l'endothélium. Cette dysfonction endothéliale causée par le stress oxydatif est présente dans de nombreuses pathologies, incluant l'hypertrophie ventriculaire gauche, la maladie vasculaire associée au diabète de type 2, l'hypertension et l'athérosclérose. Parmi les autres rôles des ERO, nous retrouvons la stimulation de la prolifération, de l'hypertrophie et de la survie cellulaires dans différents types cellulaires tels les cardiomyocytes et les CML (*Griendling et al.*, 2000 ; *Shi et al.*, 2001 ; *Irani K*, 2000). Lorsque retrouvées en concentration trop élevée, les ERO induisent des dommages et des dysfonctions au niveau mitochondrial qui perpétuent un cycle catastrophique de dysfonction cellulaire, davantage de génération de ERO, déclin mitochondrial et mort cellulaire. Ceci affecte éventuellement la fonction vasculaire et contribue au développement de maladies vasculaires chroniques (*Ballinger et al.*, 2000). Les ERO peuvent aussi servir de seconds messagers par l'activation et la production de molécules d'adhésion et/ou d'autres produits de gènes inflammatoires vasculaires. Ces molécules favorisent l'infiltration des monocytes dans la paroi vasculaire et la libération de signaux pro-inflammatoires additionnels (*Berges et al.*, 2003). Finalement, les ERO sont également impliquées dans le processus d'angiogénèse.

### **Angiotensine II**

L'Ang II est produite par une cascade enzymatique qui débute d'abord par la rénine circulante qui clive l'angiotensinogène hépatique à son extrémité N-terminale afin de former l'angiotensine I. Cette dernière est convertie, au niveau pulmonaire, en Ang II par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) (*Skeggs et al.*, 1967 ; *Dorer et al.*, 1972). On retrouve l'ECA en grande concentration au niveau de l'adventice, aussi bien que dans les CML et CE en culture (*Dzau VJ*, 1989 ; *Ekker et al.*, 1989 ; *Nafilan AJ*, 1994). Elle intervient également dans la vasorégulation au niveau endothélial par la dégradation de la bradykinine en un fragment inactif (*Dzau VJ*, 1989<sup>1</sup> ; *Caldwell et al.*, 1976).

On retrouve les récepteurs endothéliaux de l'Ang II au niveau de plusieurs lits vasculaires. Il existe 4 sous-types, les plus importants étant AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>. L'Ang II exerce de nombreuses actions sur le muscle lisse vasculaire, majoritairement par la stimulation des récepteurs AT<sub>1</sub> qui jouent sur la modulation du tonus vasomoteur (vasoconstriction), la régulation de la croissance cellulaire, la migration cellulaire, la déposition de matrice extracellulaire et la stimulation de l'inflammation (*Allen et al.*, 2000). L'activation de ce récepteur, couplé à la phospholipase C, induit également une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca<sup>++</sup> menant à la synthèse et à la sécrétion de NO et de PGI<sub>2</sub>. Ces deux facteurs vasodilatateurs antagonisent l'action vasoconstrictrice directe du peptide (*Pueyo et al.*, 1998). L'Ang II induit l'expression de facteurs de croissance et stimule la production du facteur de transformation de la croissance β1 qui module la prolifération des CML (*Gibbons GH*, 1997). Le sous-type AT<sub>2</sub>, exprimé au niveau des CML, inhibe la prolifération et l'hypertrophie induites par le sous-type 1 et il favorise l'apoptose (*Siragy HM*, 2000). L'activation de ce récepteur mène également aux relaxations dépendantes de l'endothélium dues à la BK (*Seyedi et al.*, 1995 ; *Li et al.*, 1997 ; *Gohlke et al.*, 1998). Ces récepteurs sont stimulés par une augmentation prononcée d'Ang II, suite à une inhibition pharmacologique du sous-type AT<sub>1</sub> (*Gohlke et al.*, 1998).

L'Ang II joue un rôle important dans les processus physiologiques de régulation de la pression artérielle et dans les mécanismes pathologiques impliqués dans le développement de maladies vasculaires (*Touyz et Schiffrin*, 2000). En effet, l'Ang II contribue à la pathogénèse de différentes formes d'hypertension, est un facteur important de l'athérogénèse et est impliquée dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires en induisant le stress oxydant et la dysfonction endothéliale (*Farmer et Torre-Amione*, 2001).

## **CHAPITRE 3**

### **LA CIRCULATION EXTRACORPORELLE**

## HISTORIQUE

Le développement de la CEC comme on la connaît aujourd'hui s'est fait sur plusieurs décennies et a nécessité le travail et le dévouement de plusieurs grands noms. Cette innovation a permis le développement de la chirurgie cardiaque. Grâce à elle, la réparation de lésions intracardiaques est maintenant non seulement possible mais pratiquée au quotidien à travers le monde.

La première description d'une pompe avec échanges gazeux fut faite en 1885 (*von Frey et Gruber*, 1885). Dix ans plus tard, Jacobi utilisait des poumons d'animaux pour oxygéner du sang propulser par une pompe (*Jacobi*, 1895). Par la suite, un autre pionnier important, Jay McLean, découvrit l'héparine alors qu'il était étudiant à l'hôpital Johns Hopkins. En 1935, en page couverture du magazine *Time* apparaissaient deux chercheurs : Alexis Carrel, récipiendaire d'un prix Nobel, et Charles Lindberg, le célèbre aviateur. Ils avaient alors développer un appareil permettant de perfuser une glande thyroïde de chat pendant 18 jours.

Celui ayant contribué le plus au développement de la CEC fut certainement John Gibbon, inspiré par une nuit de vigile au chevet d'un patient avec embolies pulmonaires massives. En 1937, il fut le premier à démontrer que la vie pouvait être maintenue avec succès avec un système cœur-poumon artificiel et que le cœur et les poumons natifs pouvaient ensuite reprendre leur fonction (*Gibbon*, 1937).

L'année 1951 fut marquée par les premiers essais cliniques chez l'Homme. Le 5 avril, Clarence Dennis utilisa un appareil cœur-poumon qu'il avait développé pour fermer une communication interauriculaire chez une jeune fille de 6 ans. En août de la même année, Mario Digliotti utilisait sa création pour supporter partiellement la circulation d'un patient de 49 ans pour réséquer une volumineuse tumeur médiastinale. Nous dûmes attendre un an de plus pour voir le premier succès clinique. Forest Dodrill et ses collègues ont utilisé la pompe mécanique développée par General Motors chez un homme de 41 ans pour supporter le cœur gauche lors d'une réparation mitrale. Plus tard

la même année, la même équipe obtint le premier succès clinique de support circulatoire du cœur droit (*Dodrill et al.*, 1953).



## PRINCIPES DE BASE

La CEC a permis l'essor important qu'a connu la chirurgie cardiaque en permettant au chirurgien de travailler sur un cœur immobile et en lui procurant un champ opératoire exsangue, lui permettant d'ouvrir les cavités cardiaques pour adresser les pathologies valvulaires. Ce circuit peut être adapté pour permettre un support partiel ou total, circulatoire et/ou respiratoire et du cœur gauche ou du cœur droit. Dans cette section, les principales composantes du circuit seront décrites et leur rôle expliqué.

La première action de la CEC est le drainage veineux. Typiquement, une canulation auriculaire droite simple, cavoatriale ou bicavale draine le retour systémique vers le cœur. Exceptionnellement, le drainage veineux peut se faire en périphérie via la veine fémorale. Ce drainage se fait par gravité ou par aspiration par pression négative. Ce sang veineux est ensuite dirigé vers le réservoir veineux. Ce réservoir permet de transférer de 1 à 3 litres provenant du patient vers le circuit. En plus du rôle que son nom indique, le réservoir facilite le drainage veineux (haute capacitance à basse pression), sert de trappe à bulles d'air et permet l'administration de médicaments, de fluide ou de sang. Il donne également une sécurité de quelques secondes de réaction en cas de réduction drastique ou d'arrêt du retour veineux.

Avant de retourner au patient, le sang doit subir plusieurs modifications. Le sang doit d'abord être oxygéné. Deux types d'oxygénateur ont été élaborés. Par contre, un seul est utilisé de nos jours, les oxygénateurs à bulles entraînant plus de microembolies gazeuses (*Blauth et al.*, 1990 ; *Griffin et al.*, 1991). De plus, comme chaque bulle représente une surface étrangère à laquelle le sang réagit, ce type d'oxygénateur entraîne une insulte progressive aux éléments sanguins (*Clark et al.*, 1979 ; *Edmunds et al.*, 1982). De nos jours, seuls les oxygénateurs à membrane sont utilisés. Ces derniers imitent les poumons en interposant une mince membrane de polypropylène microporeux ou de silicone entre les gaz et le sang. Puisque l'oxygène diffuse très peu dans le plasma, la surface de contact entre le sang et l'oxygène doit être très grande. La plupart des oxygénateurs sont combinés au réservoir et incorpore un échangeur thermique. Ce

dernier permet de refroidir le patient. L'hypothermie est fréquemment utilisée en chirurgie cardiaque ; modérée dans la plupart des chirurgies pour diminuer la demande en oxygène et profonde en arrêt circulatoire pour faciliter l'exposition et augmenter le degré de protection neurologique. Finalement, le sang doit être filtré. Durant la chirurgie, il y a production, tant au niveau de la CEC que du site opératoire, de microembolies gazeuses, biologiques (comme les débris athérosclérotiques, les embolies graisseuses, les particules de Ca, etc.) et non biologiques (comme les débris de tubulure, cire à os, colle, etc.) (*Reichenspurner et al.*, 2000). Ces microembolies sont responsables de la grande majorité des morbidités associées à la CEC. Les principaux organes pouvant être touché par un phénomène embolique sont le cœur, le système nerveux, les poumons, les reins le foie et le tube digestif.

Une fois le sang oxygéné et filtré, il doit être retourné au patient dans la circulation systémique, via la canule artérielle. Typiquement, la canule artérielle est insérée dans l'aorte ascendante distale. D'autres sites de canulation artérielle possibles sont l'arche distale et les artères innominée, fémorale, iliaque, axillaire et sous-clavière. Pour ce faire, une pompe est utilisée pour générer une pression de perfusion. Deux types de pompe sont disponibles ; à rouleau ou centrifuge. Un avantage, bien que controversé, des pompes centrifuges seraient qu'elles entraînent moins de dommage aux élément du sang (*Moen et al.*, 1996 ; *Tamari et al.*, 1993 ; *Driessen et al.*, 1991 ; *Wahba et al.*, 1995 ; *Ashraf et al.*, 1998 ; *Baufreton et al.*, 1999).

Durant la chirurgie, le sang s'accumule dans le péricarde et les plèvres. Ce dernier peut être récupéré par une succion de pompe et retourner au patient. Cependant, cette succion et son réservoir sont une source additionnelle d'hémolyse, de particules gazeuses, de particules lipidiques, d'aggrégats cellulaires, de dysfonction et destruction des plaquettes, de génération de thrombine et de fibrinolyse (*Mitchell et al.*, 1997 ; *Pearson*, 1986 ; *Brooker et al.*, 1998 ; *Edmunds et al.*, 1978 ; *Wright et Sanderson*, 1979).

En temps normal, le sang circulant dans le corps humain n'est en contact qu'avec une seule surface, l'endothélium. Tel que mentionné précédemment, ce dernier maintient la fluidité du sang et l'intégrité du réseau vasculaire. Les protéines de la coagulation circulent sous forme inactive dans le sang et ne sont converties dans leur forme active respective seulement lorsque stimulées. De cette façon, l'organisme est protégé d'une thrombose artérielle induite qui provoquerait une ischémie et la formation d'un caillot ne se produit que lorsqu'il y a bris de l'endothélium. De même, les cellules sanguines demeurent quiescentes jusqu'à ce qu'elles soient activées et expriment alors des récepteurs de surface et sécrètent des protéines et enzymes. L'exposition continue du sang au circuit de CEC et à des surfaces nonendothéliales au site chirurgical produit un intense stimulus prothrombotique. Cet état thrombotique implique les voies de la coagulation intrinsèque et extrinsèque ainsi que le système par contact. Cet état dicte donc l'absolue nécessité d'utiliser l'héparine, ou un autre anticoagulant dans certains cas exceptionnels, lors de l'utilisation de la CEC. Il est à noter cependant que l'héparine ne bloque pas la formation de thrombine mais l'inhibe partiellement une fois produite. La thrombine est continuellement générée et circule malgré des doses importantes d'héparine dans toute application de perfusion extracorporelle (*Boisclair et al.*, 1993 ; *Brister SJ et al.*, 1993 ; *Gorman RC et al.*, 1996 ; *Spanier et al.*, 1996 ; *Bowen FW et al.*, 2000).

## RÉPONSE INFLAMMATOIRE

La CEC déclenche une tempête inflammatoire qui débute lors du contact du sang hépariné avec la surface non endothéliale (*Lee et al.*, 1961 ; *Chenoweth et al.*, 1981 ; *Wachtfogel et al.*, 1987). Cette surface non endothélialisée est retrouvée tant au niveau du site chirurgical qu'au niveau du circuit de perfusion et active les zymogènes plasmatiques et les cellules sanguines qui constituent, en partie, la réaction d'auto-défense du corps humain. Toute chirurgie, ou traumatisme, entraîne une réponse inflammatoire. Cependant, en chirurgie cardiaque avec CEC, l'exposition continuelle du sang au circuit nonendothélialisé et la réinfusion du sang du site chirurgical au patient multiplie grandement cette réponse inflammatoire. Les principaux acteurs de cette réponse sont les protéines plasmatiques du système du complément, les neutrophiles, les monocytes, les cellules endothéliales et les plaquettes. Leurs principales réactions à la CEC sont la sécrétion de substances cytotoxiques et vasoactives, la production de cytokines de signalisation cellulaire inhibitrices et inflammatoires, l'expression de récepteurs cellulaires complémentaires qui interagissent avec des produits de signalisation spécifiques ou d'autres cellules et la production de substances vasoactives et cytotoxiques circulantes (*Downing et Edmunds*, 1992). En état de physiologie normale, ces éléments sanguins réactifs modulent et régulent la réaction de défense de l'organisme contre un stimuli néfaste (*Warren et Ward*, 2001 ; *Wewers*, 1997 ; *Fantone*, 1997). Cependant, durant la CEC, l'activation et la circulation massive de ces éléments modifient cette réponse ordonnée et ciblée.

### *Le complément*

Le système du complément est constitué d'un groupe de 30 protéines plasmatiques qui interagissent entre elles pour produire de puissantes anaphylatoxines (C3a, C4a et C5a) et le complexe terminal cytotoxique (C5b-9) (*Walport*, 2001). Ce dernier complexe, n'étant pas immédiatement létal pour les cellules eucaryotiques, peut ultimement causer des dommages cellulaires par le relâchement de métabolites de l'acide arachidonique et de radicaux libres oxygénés par les macrophages et les



### ***Les neutrophiles***

Les neutrophiles sont fortement activés pendant la CEC, principalement par la kallikréine (*Schapira et al.*, 1982) et par la C5a (*Chenoweth et Hugli*, 1978 ; *Rinder et al.*, 1995). Ce dernier induit chez les neutrophiles un chémotaxisme, une dégranulation ainsi qu'une génération d'anions superoxydes (*Smolen et Boxer*, 2001). Les neutrophiles contiennent diverses substances protéolytiques et cytotoxiques pouvant endommager différents organes. Ces derniers subissent durant la CEC un cycle d'ischémie-reperfusion résultant en l'expression de récepteurs d'adhésion (*Kilbridge et al.*, 1994), de réactifs oxygénés (*Hayashi et al.*, 2001) et de substances chémotactiques pour les neutrophiles (*Elgebaly et al.*, 1992; *Liebold et al.*, 1999).

Un autre rôle joué par les neutrophiles est la production de métabolites de l'acide arachidonique, de prostaglandines, de leukotriènes et de facteurs activateurs des plaquettes. Durant la CEC, ces substances vasoactives et cytotoxiques sont produites et relâchées dans la circulation et dans le milieu extracellulaire. Ces substances en circulation sont responsables de la plupart des manifestations de la réponse inflammatoire systémique (*Blackstone et al.*, 1982).

### ***Les monocytes***

Les monocytes sont activés pendant la CEC (*Kappelmayer et al.*, 1993) et jouent un rôle majeur dans la formation de thrombine (*Chung et al.*, 1996). Ils produisent et sécrètent également de nombreux médiateurs inflammatoires durant la phase aigue incluant des cytokines proinflammatoires, des intermédiaires réactifs oxygénés ou nitrogénés et des prostaglandines (*Lehrer et Ganz*, 2001). Finalement, ils sécrètent des cytokines ayant un effet chémotactique sur les neutrophiles et les monocytes.

### ***Les cellules endothéliales***

Les cellules endothéliales sont activées durant la CEC par plusieurs agonistes, principalement la thrombine, le C5a, l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ . Ces deux dernières induisent l'expression des P et E-sélectines, impliquées dans l'adhésion des neutrophiles et des monocytes (Warren et Ward, 2001). Ces cellules sécrètent également le NO et la PGI<sub>2</sub>, deux vasodilateurs qui augmentent la perméabilité vasculaire et donc la transmigration des leucocytes.

### ***Les plaquettes, les anaphylotoxines, les cytokines inflammatoires, les réactifs oxydants et les endotoxines***

Les plaquettes sont fortement activées durant la chirurgie tant au niveau du site chirurgical et dans le circuit. Elles participent à la réaction inflammatoire par la production et la sécrétion de plusieurs substances, dont des eicosanoïdes, de la sérotonine, des interleukines et des cytokines (Funk, 2001 ; Hawrylowicz et al., 1989 ; Fukami et al., 2001). De plus, la CEC provoque l'aggrégation des plaquettes entre elles et avec les monocytes et les neutrophiles (Rinder et al., 1992 ; Jaffé, 1991).

Les anaphylotoxines, dont les fragments C3a, C4a et C5a, ont des propriétés proinflammatoires et immunorégulatrices, provoquent la contraction des cellules musculaires lisses, augmentent la perméabilité vasculaire, attirent les cellules inflammatoires et, dans le cas du C5a, active les monocytes et les neutrophiles (Ember et al., 1998). Elles contribuent à augmenter les résistances vasculaires pulmonaires, l'œdème, la séquestration des neutrophiles et l'eau extravasculaire durant la CEC.

Finalement, suite au cycle d'ischémie-reperfusion, le cœur devient une source importante de cytokines inflammatoires et de réactifs oxydants (Hayashi et al., 2001 ; Liebold et al., 1999). Ces derniers sont également produits par les monocytes, les neutrophiles et les macrophages. Finalement, les endotoxines, qui sont des fragments de bactéries, sont de puissants agonistes du complément, des neutrophiles, des monocytes

et d'autres leucocytes. Elles proviennent de contaminants dans les solutions intraveineuses, du circuit de CEC et possiblement du système gastro-intestinal par translocation bactérienne secondaire à des changements de perfusion microvasculaire intestinale (*Neuhof et al.*, 2001).



## DYSFONCTION ENDOTHÉLIALE

Avant d'aborder le sujet plus spécifique de la dysfonction endothéliale pulmonaire secondaire à la CEC, les différents états pathologiques pouvant affecter les fonctions vasomotrices et antiplaquettaires de l'endothélium et ainsi perturber l'homéostasie cardiovasculaire seront discutés. Cette dysfonction est la résultante d'une perturbation de l'équilibre entre les EDCFs et les EDRFs.

Comme tout tissu, l'endothélium vieillit et subit une régénération qui a lieu vers la trentaine chez l'Homme. L'endothélium régénéré est dysfonctionnel quant à sa capacité d'induire des relaxations dépendantes de l'endothélium. Aussi, la dilatation secondaire à une stimulation par la sérotonine (médiée par la voie sensible à la toxine de la coqueluche et donc la protéine Gi) soit diminuée. Bien que l'expression des protéines Gi soit similaire à celle de l'endothélium natif, leur activité apparait diminuée (*Shibano et al.*, 1994) favorisant la vasoconstriction qui peut être également due à une augmentation de la production d'endoperoxydes (*Mombouli et Vanhoutte*, 1993), par une absence de libération de NO et d'EDHF (*Nakashima et Vanhoutte*, 1993) et par une augmentation de la production de  $O_2^-$  (*Shimokawa*, 1999).

Le diabète entraîne une perturbation précoce de la fonction endothéliale (*Guzik et al.*, 2002). L'hyperglycémie et l'augmentation des acides gras libres circulants dans le diabète active la NAD(P)H oxydase. L' $O_2^-$  dérive de la chaîne respiratoire mitochondriale et neutralise le NO. L'interaction du NO et du  $O_2^-$  mène à la formation de ONOO- qui oxyde la  $BH_4$  en une biophtérine incapable de stimuler la eNOS, ce qui entraîne un découplage fonctionnel de l'enzyme (*Hink et al.*, 2001). Il y a subséquemment diminution de la production du NO et donc des relaxations dépendantes de l'endothélium.

L'atteinte de la fonction endothéliale dans l'hypertension artérielle systémique se manifeste par un défaut de relaxation ainsi que par une augmentation de la réponse des CML aux facteurs contractants dérivés de l'endothélium (*Schiffrin EL*, 1992). Pour

expliquer cette diminution des relaxations dépendantes de l'endothélium, la grande majorité des études expérimentales retiennent une hausse du stress oxydant (*Lassègue et Griendling, 2004*). De plus, cette diminution n'est pas seulement due à une diminution de la libération de facteurs relaxants mais bien à une libération concomitante d'un facteur contractant (*Lüscher et Vanhoutte, 1986*). En effet, dans l'hypertension essentielle chez l'homme, cette dysfonction endothéliale est liée à une prédisposition de l'endothélium à libérer des facteurs contractants tel que le radical  $O_2^-$  qui diffuse vers les CML et qui active la COX-1 surexprimée, générant alors des endoperoxydes responsables de la contraction vasculaire (*Vanhoutte PM, 1996<sup>1</sup>*).

L'athérosclérose est une pathologie systémique chronique des vaisseaux constituant la cause principale de morbidité et de mortalité dans les pays industrialisés (*Ross R, 1986*). Les facteurs de risque de développer cette maladie incluent l'hypercholestérolémie, le vieillissement, le diabète, l'obésité, l'hypertension, le tabagisme, la déficience en œstrogène et la prédisposition génétique (*Barton et Haudenschild, 2001*). Un état de stress oxydant favorise l'adhésion et la migration des monocytes dans l'espace sous-endothélial. Ces derniers s'y transformeront en macrophages et se gorgeront de lipides pour former des cellules spumeuses. La dysfonction endothéliale est impliquée dans le développement, la progression ainsi que dans les complications liées à la maladie athérosclérotique (*Kinlay et Ganz, 1997*). Les LDL oxydées qui sont responsables du développement de la plaque d'athérome sont aussi les sources d'altérations menant à la dysfonction endothéliale (*Liao et al., 1995; Boulanger et al., 1992*). Les stades précoces de l'athérosclérose sont associés à une dysfonction sélective de la voie dépendante des protéines  $G_i$ , ces protéines étant moins exprimées dans les artères coronaires humaines athérosclérotiques (*Tsutsui et al., 1994*). Dans ces conditions, les CE expriment également une quantité moindre de la eNOS (*Liao et al., 1995*). Finalement, on note une augmentation de la production d'ET-1 (*Boulanger et al., 1992*).

Dans notre laboratoire, nous avons caractérisé la survenue d'une dysfonction endothéliale au niveau des artères coronaires (Stevens et al., 2006) et des artères

pulmonaires (Fortier et al., 2004 ; Lamarche et al., 2004) suivant l'utilisation de la CEC. Le reste de ce chapitre se concentrera sur la dysfonction au niveau des artères pulmonaires. Premièrement, l'amplitude de la contraction indépendante de l'endothélium, c'est-à-dire après exposition d'anneaux d'artères au KCl et à la phényléphrine, est diminuée. Cette vasoplégie est probablement attribuable à une hausse des concentrations d'iNOS. Nous avons mis en évidence une diminution de la relaxation dépendante de l'endothélium suite à la stimulation à l'ACh et à la BK après 90 minutes de CEC et 60 minutes de reperfusion. Il est important de noter que cette dysfonction ne se produit pas après la CEC seule, mettant ainsi en cause le stress oxydant causé par la production massive de radicaux libres neutralisant le NO lors de la reperfusion (Lamarche et al., 2004). Un autre groupe a également étudié la fonction endothéliale pulmonaire et systémique dans un modèle expérimental (Serraf et al., 1999). Ils soumettaient des porcelets à une CEC totale de 90 minutes et ensuite une reperfusion de 60 minutes. La viabilité des cellules endothéliales était diminuée de 50% dans les deux groupes, résultat des effets cytotoxiques des leucocytes circulants. Pour ce qui est de la fonction endothéliale, ils ont observé une diminution de la relaxation dépendante de l'endothélium seulement au niveau des artères pulmonaires, suggérant un rôle du cycle d'ischémie-reperfusion. Effectivement, la réponse à l'ACh était de 60% et 25% la relaxation du groupe contrôle après 90 minutes de CEC et après 90 minutes de reperfusion respectivement. La relaxation à l'ACh des artères fémorales n'était pas altérée. La CEC entraîne également une baisse de l'expression de la eNOS au niveau du lit pulmonaire (Sato et al., 2000) se traduisant par une diminution de la production de NO. Cliniquement, ceci peut entraîner une vasoconstriction et une hypertension artérielle pulmonaire documentée (Morita et al., 1996). Dans un modèle expérimental connu, la diminution de la relaxation dépendante de l'endothélium à l'ACh suivant 150 minutes de CEC et 60 minutes de reperfusion se normalise 14 jours suivant l'exposition à la CEC, démontrant la réversibilité de cette dysfonction endothéliale (Nyhan et al., 1999).

## DYSFONCTION PULMONAIRE SUIVANT LA CEC

Souvent nommée « syndrome post pompe » (post pump syndrome), l'atteinte pulmonaire suivant la CEC peut prendre un degré de sévérité très variable, allant de changements physiologiques minimes au très redouté syndrome de détresse respiratoire aiguë (ARDS). Bien que cette complication soit rare et qu'elle ne survienne que dans 1.3% des cas de chirurgie cardiaque, elle est associée à un taux de mortalité élevé, de l'ordre de 50% (Mora et al., 1995).

Bien que le poumon subit les conséquences de la réaction inflammatoire systémique accompagnant la CEC, il y contribue en partie. En effet, il y contribue par la synthèse de médiateurs comme l'endothéline et les radicaux libres ainsi que par l'activation d'éléments figurés du sang. Le rôle du poumon dans cette réaction globale ne peut être quantifié. Physiopathologiquement, on observe au niveau du poumon une activation du complément, une séquestration de leucocytes, une synthèse de radicaux libres, une baisse de l'expression de la eNOS et de la concentration de NO localement et une synthèse d'interleukines.

Plusieurs mécanismes se combinent pour donner l'atteinte pulmonaire. Durant la CEC, la circulation dans les artères pulmonaires est minimale ce qui fait que les poumons ne sont perfusés que par les artères bronchiques. Ce cycle ischémie-reperfusion combiné à l'hémodilution, la diminution de la pression oncotique plasmatique et les élévations temporaires de la pression de l'oreillette gauche ou du système veineux pulmonaire durant la CEC ou lors du sevrage contribuent ensemble à l'augmentation du volume extravasculaire pulmonaire et donc à l'œdème pulmonaire (Maggart et Stewart, 1987 ; Lloyd et al., 1984). Les microembolies (Allardyce et al., 1966) et les médiateurs circulants cellulaires, vasoactifs et cytotoxiques de la réponse inflammatoire (Tonz et al., 1995 ; Chenoweth et al., 1981 ; Royston et al., 1986 ; Craddock et al., 1977 ; Hammerschmidt et al., 1981) atteignent les poumons par la circulation bronchique ou lors du sevrage de la CEC. Ces agents augmentent la perméabilité capillaire pulmonaire, l'œdème périvasculaire et les sécrétions bronchiques

et pourraient être responsable de changements au niveau du surfactant alvéolaire (McGowan *et al.*, 1993). La combinaison de l'augmentation du volume interstitiel pulmonaire, de l'augmentation des sécrétions, du surfactant altéré, de la condition pulmonaire de base du patient et des conséquences de la chirurgie diminue la compliance pulmonaire, la capacité résiduelle fonctionnelle et augmente le travail respiratoire (Oster *et al.*, 2000). Ceci entraîne de l'atélectasie régionale, une augmentation de la susceptibilité à l'infection et une augmentation du shunt physiologique artério-veineux ce qui diminue la  $\text{PaO}_2$  artérielle systémique et augmente le  $\text{AaDO}_2$ .

## **CHAPITRE 4**

### **L'HYPERTENSION ARTÉRIELLE PULMONAIRE**

Dans sa définition la plus simple, l'HTP est définie par une pression artérielle pulmonaire (PAP) systolique supérieure à 25 mmHg au repos ou supérieure à 30 mmHg à l'exercice avec une pression capillaire bloquée (wedge) et une pression télédiastolique du ventricule gauche inférieure à 15 mmHg (*Gaine et Rubin, 1998*).

L'HTP comprend la forme primaire, ou idiopathique, où l'on retrouve une incidence familiale dans environ 10% des cas. Elle comprend également la forme survenant suite à l'exposition à certains facteurs reconnus comme l'hypoxie (*Farber et Loscalzo, 2004*) et l'utilisation de médicaments anorexigènes, de cocaïne ou d'amphétamines (*Rubin et al., 1993*). Certaines conditions médicales ont une association reconnue avec l'HTP dont l'hypertension portale, l'infection au VIH, les maladies systémiques du collagènes (surtout avec la sclérodermie associée au CREST), l'infection au virus de l'herpès humain 8 (*Cool et al., 2003*), la thrombocytose avec syndrome chronique myélodysplasique, certaines hémoglobinopathies et le syndrome d'Osler-Rendu-Weber (*Farber et Loscalzo, 2004*). Finalement, elle comprend toutes les formes d'hypertension veineuse pulmonaire, associées à une maladie pulmonaire, dues à une maladie thromboembolique chronique ou secondaires à une atteinte de la vasculature pulmonaire. Le Tableau 1 résume en détail les différentes étiologies de l'HTP.

Peu importe la forme de l'HTP, l'apparence histologique est semblable : fibrose intimale, épaissement de la média, occlusion artériolaire pulmonaire et lésion plexiformes (*Rubin, 1997*). Au niveau vasculaire, on retrouve une vasoconstriction soutenue, une prolifération des cellules musculaires lisses et des cellules endothéliales et un phénomène de thrombose. Tout ces phénomènes suggèrent une perturbation de l'équilibre entre les agents vasoconstricteurs et vasodilateurs, les facteurs mitogéniques et les inhibiteurs de croissance, et les déterminants antithrombotiques et prothrombotiques. Ce déséquilibre favorise la vasoconstriction, la prolifération cellulaire et la thrombose amenant donc l'hypothèse d'une dysfonction endothéliale (*Farber et Loscalzo, 2004*).

1. Pulmonary Arterial Hypertension
  - 1.1 Primary Pulmonary Hypertension
    - (a) Familial
  - 1.2 Associated with:
    - (a) Connective Tissue Disease
    - (b) Congenital Heart Disease
    - (c) Portal Hypertension
    - (d) HIV Infection
    - (e) Drugs/Toxins
      - (1) Anorexigens
      - (2) Other
  - 1.3 Persistent Pulmonary Hypertension of the Newborn
  - 1.4 Pulmonary Veno-Occlusive Disease
  - 1.5 Pulmonary Capillary Hemangiomatosis
2. Pulmonary Venous Hypertension
  - 2.1 Left-Sided Atrial or Ventricular Heart Disease
  - 2.2 Left-Sided Valvular Heart Disease
  - 2.3 Extrinsic Compression of Central Pulmonary Veins
    - (a) Fibrosing Mediastinitis
    - (b) Adenopathy/Tumors
  - 2.4 Other
3. Pulmonary Hypertension Associated with Disorders of the Respiratory System and/or Hypoxemia
  - 3.1 Chronic Obstructive Pulmonary Disease
  - 3.2 Interstitial Lung Disease
  - 3.3 Sleep Disordered Breathing
  - 3.4 Alveolar Hypoventilation Disorders
  - 3.5 Chronic Exposure to High Altitude
  - 3.6 Neonatal Lung Disease
  - 3.7 Alveolar-Capillary Dysplasia
  - 3.8 Other
4. Pulmonary Hypertension Due to Chronic Thrombotic and/or Embolic Disease
  - 4.1 Thromboembolic Obstruction of Proximal Pulmonary Arteries
  - 4.2 Thromboembolic Obstruction of the Distal Pulmonary Arteries
  - 4.3 Pulmonary Embolism (Tumor, OVA parasites, Foreign Material)
5. Pulmonary Hypertension due to Disorders Directly Affecting the Pulmonary Vasculature
  - 5.1 Inflammatory
    - (a) Schistosomiasis
    - (b) Sarcoidosis
    - (c) Histocytosis X
    - (d) Other

---

**TABLEAU 1.** Classification clinique de l'HTP. Tiré de *McLaughlin et Rich*, 2004.

La  $\text{PGI}_2$  et la  $\text{TXA}_2$  sont les deux principaux métabolites de l'acide arachidonique synthétisés par les cellules endothéliales. Les actions de la  $\text{PGI}_2$  sont la



vasodilatation, l'inhibition de l'activation plaquettaire et un effet antiprolifératif sur les cellules musculaires lisses. À l'inverse, la  $\text{TXA}_2$  a une action vasoconstrictrice et active les plaquettes (*Gerber et al.*, 1980). Pour les patients avec HTP, un déséquilibre favorise la  $\text{TXA}_2$ . En effet, dans l'urine de ces patients, le métabolite de la  $\text{PGI}_2$  (le 6-céto-prostacycline  $\text{F}_{2\alpha}$ ) est diminué tandis que le métabolite de la  $\text{TXA}_2$  (thromboxane  $\text{B}_2$ ) est augmenté (*Christman et al.*, 1992). De plus, la production de  $\text{PGI}_2$  synthétase est diminuée dans les artères pulmonaires de petit et moyen calibre, particulièrement chez les patients avec HTP idiopathique (*Tuder et al.*, 1999).

Tel que mentionné précédemment, l'ET-1 est un puissant vasoconstricteur qui stimule la prolifération des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires. Chez les patients avec HTP, le taux plasmatique d'ET-1 est élevé (*Allen et al.*, 1993 ; *Giaid et al.*, 1993 ; *Vincent et al.*, 1993).

Le taux de eNOS au niveau des artères pulmonaires est également diminué (*Giaid et Saleh*, 1995 ; *McQuillan et al.*, 1994) sauf dans des lésions plexiformes où il est augmenté, promulgant probablement la prolifération cellulaire endothéliale (*Mason et al.*, 1998).

D'autres acteurs sont également incriminés. La sérotonine (*Herve et al.*, 1995 ; *Herve et al.*, 1990 ; *Abenhaim et al.*, 1996 ; *Eddahibi et al.*, 2001) est un vasoconstricteur qui promouvoit l'hypertrophie et l'hyperplasie des cellules musculaires lisses (*Lee et al.*, 1994). Bien que l'adrenomédulline vasodilate les artères pulmonaires, augmente le débit sanguin pulmonaire et jouerait un rôle homéostasique au niveau de la circulation pulmonaire (*Nicholls et al.*, 2001), il serait plus un marqueur qu'un agent causal de l'HTP. Finalement, le peptide vasoactif intestinal a également été incriminé (*Petkov et al.*, 2003). Il diminuerait la pression artérielle pulmonaire chez l'humain (*Soderman et al.*, 1993), inhiberait l'activation plaquettaire (*Cox et al.*, 1984) et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (*Maruno et al.*, 1995).

Le traitement de l'HTP s'est drastiquement amélioré pendant la dernière décennie, diminuant les symptômes et prolongeant la survie. Le premier but du traitement de l'HTP est de réduire les symptômes. L'oxygénothérapie avec l'instauration d'un diurétique est habituellement la première étape. L'examen postmortem de patients avec HTP primaire idiopathique et la démonstration d'un phénomène thrombotique ont amené l'idée d'une thérapie anticoagulante (*Bjornsson et Edwards*, 1985). Bien qu'il y ait peu de littérature scientifique pour soutenir ceci (*Fuster et al.*, 1984 ; *Rich et al.*, 1992), il est recommandé de maintenir un INR entre 1,5 et 2,5. Puisque la vasoconstriction semble contribuer à la pathogenèse de l'HTP, des vasodilatateurs ont été utilisés. Pour identifier les patients pouvant bénéficier d'un traitement à long terme aux bloqueurs calciques, un challenge aux vasodilatateurs à courte action tels que la PGI<sub>2</sub> intraveineuse, l'adénosine ou le NO inhalé (*Sitbon et al.*, 1998 ; *Sitbon et al.*, 2003) peut être tenté avec un prolongement de la survie chez les répondeurs (*Rich et al.*, 1992 ; *Sitbon et al.*, 1998 ; *Sitbon et al.*, 2003). La PGI<sub>2</sub> semble un agent de choix puisqu'elle induit la relaxation du muscle lisse vasculaire, inhibe la prolifération de ces dernières et inhibe l'aggrégation plaquettaire. La forme intraveineuse de ce traitement, l'époprostenol, fut utilisé pour la première fois dans l'HTP primaire dans le début des années '80 (*Higenbottam et al.*, 1984). L'époprostenol intraveineux améliorerait la tolérance à l'exercice, l'hémodynamie et la survie (*Sitbon et al.*, 2002). Cependant, sa voie d'administration et sa courte demie-vie (qui oblige son administration de façon continue) n'en ont pas fait un agent idéal. Ceci a mené au développement du prostinil, un analogue stable de la PGI<sub>2</sub> pouvant être administré par voie sous-cutanée (*Simonneau et al.*, 2002 ; *Vachiéry et al.*, 2002). Cependant, ce dernier doit également être administré de façon continue. Le beraprost sodique est le premier analogue biologiquement stable et oralement actif (*Okano et al.*, 1997). L'iloprost quant à lui s'administre par la voie inhalée (*Hoepfer et al.*, 2000). Finalement, les antagonistes des récepteurs de l'endothéline sont non sélectifs comme dans le cas du bosentan (*Rubin LJ et al.*, 2002 ; *Channick et al.*, 2001) qui se prend de façon orale ou sélectifs pour les récepteurs ET<sub>A</sub> comme le sitaxsentan (*Barst RJ et al.*, 2002 ; *Barst RJ et al.*, 2004) et le ambrisentan.

## **CHAPÎTRE 5**

### **SOLUTIONS À LA DYSFONCTION PULMONAIRE POST CEC**

En plus des problèmes d'oxygénation qu'occasionne la dysfonction pulmonaire post-CEC, l'hypertension pulmonaire pouvant se développer augmente le travail du ventricule droit. La dysfonction ventriculaire droite post-CEC a un très mauvais pronostic avec des taux de mortalité de l'ordre de 44 à 86% (*Davila-Roman et al.*, 1995). Il est donc important de développer d'autres moyens de prévenir et traiter cette condition. Trois avenues furent étudiées et/ou utilisées. Premièrement, les techniques de ventilation durant la CEC visant à diminuer l'atélectasie. Deuxièmement, la perfusion de la circulation pulmonaire afin de diminuer les phénomènes d'ischémie-reperfusion. Finalement, plusieurs traitements pharmacologiques agissent à différents niveaux.

Traditionnellement, la ventilation mécanique est interrompue pendant la CEC pour libérer le champ opératoire. Dans notre laboratoire, chez un modèle porcin, nous avons démontré que de continuer la ventilation pendant la CEC diminuait la dysfonction endothéliale pulmonaire (*Gagnon et al.*, 2001). Un autre groupe, également chez un modèle porcin, a démontré que les manœuvres de recrutement à la sortie de CEC diminuaient le shunt intrapulmonaire (*Magnusson et al.*, 1998). Certains auteurs ont également tenté de démontrer l'effet de stratégies de ventilation chez l'humain. Ainsi, il a été démontré que la pression positive continue (CPAP) dans l'arbre respiratoire pendant la CEC améliore l'oxygénation en post-opératoire avec un meilleur ratio ventilation/perfusion (V/Q) et un plus faible AaDO<sub>2</sub> (*Loeckinger et al.*, 2000).

D'autres groupes ont orienté leurs recherches vers la perfusion de l'artère pulmonaire pour éviter l'ischémie. Ainsi, la perfusion pulmonaire à bas débit pendant la CEC entraîne une baisse des résistances vasculaires pulmonaires, une hausse du débit cardiaque et une hausse de la PaO<sub>2</sub> (*Serraf et al.*, 1997). Cependant, aucune diminution significative de la dysfonction endothéliale des artères pulmonaires, caractérisée par une diminution des relaxations dépendantes de l'endothélium après stimulation par l'ACh, n'a pu être démontrée. Un autre groupe a utilisé une solution cristalloïde pour perfuser la circulation pulmonaire durant la CEC. Ils ont observé une diminution des résistances vasculaires pulmonaires et des pressions de ventilation pulmonaire en sortie de CEC

(Liu *et al.*, 2000). Finalement, une technique utilisant les poumons du patient comme oxygénateur a été étudiée chez 15 patients et été comparée à 15 contrôles. Ainsi, le sang était aspiré de l'oreillette droite, injecté dans l'artère pulmonaire, réaspiré de l'oreillette gauche et finalement acheminé dans l'aorte. Dans ce modèle, la sécrétion d'interleukines 6 et 8 fut diminuée de façon significative ainsi que le délai d'extubation et l'oxygénation améliorée (Richter *et al.*, 2000).

La première classe de médicaments utilisés dans le traitement de la dysfonction pulmonaire post-CEC est la PGI<sub>2</sub> et ses analogues. Dans notre laboratoire et avec le même modèle porcin, la nébulisation d'époprosténol pendant la CEC a entraîné une hausse de la quantité d'AMPc dans les artères pulmonaires. Nous avons de plus observé une amélioration de l'oxygénation avec le traitement à l'époprosténol objectivé par un meilleur ratio PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> (Fortier *et al.*, 2004). Un autre groupe de notre centre a utilisé des doses de 60 µg d'époprosténol administré avant l'incision chez des patients atteints d'HTP. Ils ont démontré une baisse des pressions pulmonaires et une baisse du travail ventriculaire droite sans effets secondaires (Haché *et al.*, 2003). Finalement, un groupe a étudié l'utilisation d'iloprost (PGI<sub>2</sub> intraveineuse) dans un modèle de poumon de rat perfusé. Ils ont observé une diminution de l'œdème pulmonaire par un mécanisme impliquant probablement l'inhibition d'endothéline puisque les métabolites de l'endothéline sont diminués dans le sang veineux pulmonaire (Kawashima *et al.*, 2002).

L'utilisation de NO inhalé a aussi été décrite chez le porc et l'humain (Maxey *et al.*, 2002 ; Lamarche *et al.*, 2004). Elle entraîne une diminution de la dysfonction endothéliale suivant la CEC et une amélioration de la pression de l'artère pulmonaire, du travail du ventricule droit et de l'oxygénation. Les principaux inconvénients du NO inhalé est l'équipement coûteux et spécialisé nécessaire et la nécessité de monitoriser ses métabolites toxiques. De plus, la nitroglycérine intraveineuse est couramment utilisée chez les patients atteints d'HTP suivant la CEC.

La milrinone est un inhibiteur de la phosphodiesterase de type III qui augmente la concentration intracellulaire d'AMPc en diminuant sa dégradation. Disponible dans

tous les établissements où il se fait de la chirurgie cardiaque, elle est beaucoup moins dispendieuse. Son administration par voie intraveineuse est très répandue dans les unités de chirurgie cardiaque. L'indication la plus fréquente est le bas débit cardiaque. Effectivement, il a été démontré que la milrinone augmente l'index cardiaque (*Kikura et al.*, 1997 ; *Lobato et al.*, 1998 ; *Iwagaki et al.*, 2001 ; *Shibata et al.*, 2001 ; *Kim et al.*, 2003 ; *Hoffman et al.*, 2003 ; *Maslow et al.*, 2004) et facilite le sevrage de la CEC (*Doolan et al.*, 1997). Le principal problème avec l'administration intraveineuse de milrinone est le taux élevé hypotension systémique par vasodilatation ou obstruction de la voie de chasse des ventricules droit ou gauche (*Denault et al.*, 2006<sup>1</sup>) nécessitant l'utilisation de vasopresseurs (*Lobato et al.*, 1998 ; *Kim et al.*, 2003 ; *Yamada et al.*, 2000 ; *Solina et al.*, 2000). Cet effet vasodilatateur sous-tend l'autre indication de la milrinone intraveineuse, i.e. l'HTP. En effet, dans la dysfonction endothéliale pulmonaire post-CEC, la biodisponibilité du NO est diminuée. Pour pallier au déficit en NO, un mécanisme possible est d'augmenter la concentration d'AMPc dans la cellule musculaire lisse, ou d'en diminuer la dégradation. Dans le but de diminuer les effets systémiques néfastes de la milrinone, plusieurs se sont tournés vers l'administration par voie inhalée. Cette voie d'administration ne nécessite pas d'équipement dispendieux comme pour le NO inhalé, un simple nébulisateur étant suffisant. Utilisant un modèle porcin soumis à un protocole de CEC, notre laboratoire a étudié l'administration de la milrinone inhalée (*Lamarche et al.*, 2005). Nous avons démontré que cette dernière prévient l'altération de la relaxation artérielle pulmonaire à l'Ach et améliore la relaxation médiée à la BK, diminue la sensibilité du muscle lisse vasculaire aux agents vasoconstricteurs, diminue le travail myocardique et améliore l'oxygénation et ce de façon plus sécuritaire que par voie intraveineuse, causant moins de tachycardie et d'hypotension systémique. Deux études ont revu l'effet de la milrinone inhalée chez l'humain après une chirurgie cardiaque et ont démontré une diminution de la pression artérielle pulmonaire sans causer d'hypotension systémique (*Haraldsson et al.*, 2001 ; *Sablitzki et al.*, 2005).

## SILDÉNAFIL

Le sildénafil est un inhibiteur de la phosphodiesterase de type V principalement utilisé en administration orale dans le traitement de la dysfonction érectile. La phosphodiesterase de type V inactive la GMPc synthétisée par la guanylate cyclase (GC) après stimulation par le NO dans le muscle lisse vasculaire. En inhibant la phosphodiesterase, le sildénafil limite donc le métabolisme du produit final de la voie du NO, conservant son effet vasodilatateur. Ce type de phosphodiesterase est retrouvé dans peu de tissu (poumon, plaquette, muscle lisse) et semble donc plus spécifique pour l'effet recherché (*Raja et al.*, 2004).

L'utilisation du sildénafil dans le traitement de l'hypertension a d'abord été étudiée dans des modèles animaux. Il a été démontré que l'administration intraveineuse dans un modèle d'aspiration méconiale chez le porcelet causant une HTP entraîne une chute de 40% des résistances pulmonaires, une hausse de 30% du débit cardiaque sans effets néfastes sur l'oxygénation (*Shekerdemian et al.*, 2002). Dans un modèle d'HTP chez le mouton provoqué par une perfusion d'un analogue de la TXA<sub>2</sub>, l'administration de sildénafil inhalé concomitamment avec du NO inhalé potentialise l'effet de ce dernier sans altération de l'oxygénation ou du shunt gauche-droit (*Ichinose et al.*, 2001). Chez l'humain, l'administration préopératoire de sildénafil *per os* à des patients avec HTP était supérieure au NO inhalé pour augmenter le débit cardiaque sans augmenter la pression capillaire pulmonaire bloquée (wedge) avec une baisse parallèle de la pression de l'artère pulmonaire (*Michelakis et al.*, 2002). Finalement, dans un modèle de vasoconstriction pulmonaire hypoxique chez des humains respirant de l'oxygène à 11% entraînant une hausse de près de 50% des pressions de l'artère pulmonaire chez le groupe contrôle, l'administration orale de sildénafil a empêché le développement d'HTP (*Zhao et al.*, 2001).

Un seul groupe a étudié l'effet du sildénafil administré en inhalation (*Ichinose et al.*, 2001). Ils utilisaient un modèle animal, l'agneau, d'HTP induite par perfusion continue d'un analogue de la TXA<sub>2</sub>. Ils ont étudié l'effet de l'inhalation du sildénafil

avec ou sans administration concomitante de NO inhalé. Ils ont observé que la nébulisation de sildénafil ne diminuait pas l'oxygénation systémique, n'augmentait pas le shunt intrapulmonaire droit-gauche ni n'altère l'effet bénéfique du NO.



## **HYPOTHÈSES ET BUTS**

La dysfonction endothéliale pulmonaire se manifeste par une diminution des relaxations dépendantes de l'endothélium *in vitro*. Cliniquement, ceci peut entraîner de l'HTP, une diminution de l'oxygénation et une augmentation du travail ventriculaire droite pouvant entraîner une défaillance de ce dernier. Pour pallier à cette complication, plusieurs outils s'offrent à nous. Bien que la ventilation ait donné des résultats intéressants chez le porc, cette méthode est peu attrayante pour la clinique, les poumons pouvant gêner le champ chirurgical. Le NO inhalé n'est pas disponible partout et nécessite des équipements coûteux. L'agent le plus utilisé en clinique demeure la milrinone intraveineuse mais ce dernier s'accompagne d'hypotension par vasodilatation systémique, phénomène indésirable dans le contexte postopératoire. Comme nous pouvons le constater, le traitement idéal reste à développer.

Nous avons vu ces dernières années l'utilisation de plus en plus fréquente du sildénafil dans l'HTP. Tel que mentionné précédemment, le sildénafil tire son effet bénéfique en limitant la dégradation du produit final de la voie du NO, compensant donc pour la diminution de la production de ce dernier. Également, nous avons contribué à la montée en l'intérêt pour l'utilisation de la milrinone par voie inhalée dans le même contexte. Nous avons donc, dans le présent travail, étudié l'effet du sildénafil sur la dysfonction endothéliale pulmonaire après une chirurgie cardiaque sous CEC dans un modèle porcin déjà bien établi. Deux modes d'administration ont été étudiés : la voie intraveineuse et la voie inhalée qui ciblera plus le parenchyme pulmonaire et donc causera moins d'effets secondaires systémiques néfastes, étant délivré directement à son site d'action sans emprunter le système cardiovasculaire. De plus, pour déterminer le temps idéal d'administration, nous avons administré le sildénafil inhalé avant et après la CEC. Finalement, en plus d'analyser l'effet du sildénafil sur les relaxations dépendantes de l'endothélium des artères pulmonaires, nous avons analysé son effet au niveau de l'oxygénation et sur le profil hémodynamique.

**CONTRIBUTION ORIGINALE**

# Differential Effects of Inhaled and Intravenous Sildenafil in the Prevention of the Pulmonary Endothelial Dysfunction Due to Cardiopulmonary Bypass

Marie-Claude Aubin, MSc<sup>1\*</sup>, Steve Laurendeau, MD<sup>2\*</sup>, Arnaud Mommerot, MD<sup>2,3</sup>, Yoan Lamarche, MD<sup>2</sup>, André Denault, MD<sup>3</sup>, Michel Carrier, MD<sup>2</sup>, and Louis P. Perrault, MD, PhD<sup>1,2</sup>

1 Department of Pharmacology of the Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

2 Department of Surgery of the Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, Canada

3 Department of Cardiovascular Surgery. University Hospital. Strasbourg, France

4 Department of Anesthesiology of the Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, Canada

**Running Head:** Sildenafil prevents endothelial dysfunction

**Word count:** 3 480

---

\*Corresponding author. Tel.: 514-376-3330; fax: 514-376-1355. E-mail: [REDACTED] (L.P. Perrault)

## Abstract

The objective of the present study was to evaluate the effects of inhaled and intravenous sildenafil on the pulmonary endothelium-dependent relaxations, the hemodynamic profile and oxygenation after cardiopulmonary bypass. Five groups of Landrace swine were compared: 1) control; 2) cardiopulmonary bypass: 90 min of normothermic cardiopulmonary bypass; 3) pre-cardiopulmonary bypass sildenafil nebulisation; 4) post-cardiopulmonary bypass sildenafil nebulisation; 5) intravenous sildenafil administration prior to cardiopulmonary bypass. All groups underwent a 60-min period of pulmonary reperfusion after cardiopulmonary bypass. Vascular reactivity of 2<sup>nd</sup> degree pulmonary arteries was evaluated in response to acetylcholine and bradykinin. Cardiopulmonary bypass caused a significant decrease in endothelium-dependent relaxations to both agonists; this dysfunction was prevented by administration of sildenafil, both intravenous and inhaled ( $p<0.05$ ). Both administration routes prevented the significant increase in mean pulmonary arterial pressure with a safe hemodynamic profile. Moreover, intravenous and inhaled sildenafil after CPB also prevented the increase in alveolo-arterial gradient ( $p<0.05$ ). Both sildenafil formulations of administration prevent the occurrence of pulmonary endothelial dysfunction. Depending on the administration moment and the route, the administration of sildenafil improves the hemodynamic profile and post CPB oxygenation.

**Keywords:** Endothelium; Pulmonary arterial pressure; Cardiopulmonary bypass; Inflammatory response

**Word count:** 181

## 1. Introduction

The physiological alterations, including the induction of a systemic inflammatory response, following cardiopulmonary bypass (CPB) were recognized early after its introduction in the 1950s. During CPB, the blood flow is diverted from the right atrium to the CPB pump and is pumped back into the aorta. Since there is reduced flow in the pulmonary arteries, the lungs are perfused only by the bronchial arteries for the duration of CPB and are therefore submitted to ischemia. At separation from CPB, as ventilation and flow to the pulmonary arteries are resumed, lungs undergo reperfusion and suffer from ischemia-reperfusion injury due to exposure to oxygen free radicals. Activated neutrophils and platelets contribute to the pulmonary damage. The "post-pump syndrome" is characterized by an increase in pulmonary capillary permeability leading to decreased oxygenation, manifested by an increase in the alveolo-arterial gradient in  $O_2$  associated with decreased pulmonary compliance and increased pulmonary vascular resistance [1]. A pulmonary arterial endothelial dysfunction occurs following CPB [2] and contributes to pulmonary hypertension which increases right ventricular work. Right ventricular dysfunction following CPB carries a poor prognosis with a perioperative mortality ranging from 44% to 86% [3]. This highlights the importance of finding new effective treatment to prevent this condition.

The endothelium has an important role in regulating the vascular tone, inhibiting platelet aggregation and neutrophil adhesion through the release of vasorelaxing and vasocontracting factors. Endothelial dysfunction can be defined as an imbalance between relaxing factors and contracting factors, resulting in the loss of the normal protective role of the endothelium on the homeostasis of the vascular wall [4].

Several pharmacological agents have been used to limit the occurrence of pulmonary hypertension following cardiac surgery including intravenous nitroglycerin, inhaled nitric oxide (NO), inhaled prostacyclin and intravenous milrinone. Milrinone, a type III phosphodiesterase inhibitor, increases intracellular levels of cAMP by limiting its degradation. In a previous study using intravenous administration of milrinone, systemic vascular resistances decreased, causing hypotension [5]. This can be hazardous in the hours following cardiac surgery and may require support with vasopressor drugs. Moreover, intravenous milrinone does not prevent pulmonary endothelial dysfunction and is associated with an increased alveolo-arterial gradient in  $O_2$  60 min after bypass ( $p < 0.05$ ), most likely due to shunting. Inhaled milrinone prevented the alterations in relaxation of pulmonary arteries to acetylcholine caused by CPB and improved relaxations to bradykinin [5]. No positive effects on the pulmonary artery pressure or resistance were observed. Trials in patients undergoing cardiac surgery are ongoing to explore the effects of this mode of administration in the clinical arena.

Sildenafil is a type V phosphodiesterase inhibitor mainly used in the treatment of erectile dysfunction. Phosphodiesterase V inactivates cyclic guanosine monophosphate (cGMP) synthesised by guanylate cyclase after stimulation by NO in the vascular smooth muscle. By inhibiting phosphodiesterase V, sildenafil limits the metabolism of NO end-products, thus enhancing its vasodilatory effect. Type V is seldom found in tissue [6] and appears more specific to the lung. Several authors have reported the use of sildenafil in the treatment of pulmonary hypertension, relaxing isolated human vessels [7] and reducing the pulmonary hypertension in animal models [8-10]. Zhao and colleagues used a model of hypoxic pulmonary vasoconstriction in humans after

inhalation of 11% oxygen. The control group showed a 50% rise in pulmonary artery pressures and the sildenafil group (100 mg *per os*) developed no pulmonary hypertension [11]. Intravenous sildenafil was used in a study by Shekerdemian and colleagues in a model of meconial aspiration in the pig which showed a 40% decrease in pulmonary vascular resistance and a 30% increase in cardiac output without change in oxygenation [12].

The purpose of the present study was to evaluate the effects of inhaled and intravenous sildenafil, administered prior or after CPB on pulmonary artery endothelial function.

## **2. Methods**

### *2.1. Experimental preparation for all groups (Anaesthesia)*

All experiments were performed using Landrace swine (McGill University, Montreal, QC, CAN) of either gender, aged 8 weeks and weighing  $26 \pm 2.5$  kg. Animals were maintained and tested in accordance with the recommendations of the guidelines on the Care and Use of Laboratory Animals issued by the Canadian Council on Animal. The piglets were fasted for 12 hours prior to surgery and sedated with intramuscular ketamine hydrochloride (25 mg/kg) (Ayerst Veterinary Laboratories, Guelph, ON, CAN) and Xylazine (10 mg/kg) (Boehringer Ingelheim, Burlington, ON, CAN) and induction was achieved using mask ventilation with 2% isoflurane (Abbott Laboratories Limited, St-Laurent, QC, CAN). They were subsequently intubated and mechanically ventilated with a constant oxygen and air mixture (3:2, or  $\text{FiO}_2 = 0.66$ ) at 14 breaths strokes/min and tidal volume of 6-8 ml/kg. Anesthesia was maintained with 1% isoflurane



inhalation. Arterial and venous blood gases were measured at regular intervals and maintained within physiological limits by adjusting the ventilation rate and tidal volume.

## 2.2. *Experimental groups*

### 2.2.1. GROUP 1: CONTROL ( $N = 6$ )

After skin preparation, the mediastinum was exposed via a median sternotomy. 300 UI/kg heparin (Leo Pharma Inc. Ajax, ON, CAN) were given intravenously. After 1 hour of general anaesthesia with 1% isoflurane, the animal was exsanguinated and the lungs harvested.

### 2.2.2. GROUP 2: CARDIOPULMONARY BYPASS ( $N = 6$ )

After skin preparation and draping with sterile fields, a median sternotomy was performed and the pericardium opened. After heparin administration (400 UI/kg), a double purse string was made on the proximal ascending aorta and a single purse string on the right atrium. A blood sample was drawn from the right atrium and anticoagulation assessed using an activated coagulation time (ACT) with Hemochron 801 (Technidyne, NJ, USA). The aorta and right atrium were cannulated when ACT was superior to 300 sec, with a 22-Fr and a 29/29-Fr double staged cannulas (DLP Inc., Grand Rapids, MI, USA) respectively. After cannulation, CPB was initiated when ACT was superior to 400 sec. Ventilation was stopped throughout the CPB period. Anaesthesia was maintained using the jugular vein line with a continuous infusion of Propofol (0.1 to 0.2 mg/kg/min) (Pharmascience Inc., Montreal, QC, CAN). The CPB circuit consisted of a hollow fiber membrane oxygenator with incorporated filtered hardshell venous reservoir (Monolyth, Sorin, Irvine, CA, USA), a heater-cooler and a roller pump (Sarns 7000, Ann Harbor, MI, USA). The circuit was primed with Pentaspan 500 ml (10% Pentastarch, DuPont Pharma Inc., Mississauga, ON, CAN),

Ringer's lactate 250 ml, heparin 5000 UI, mannitol 12.5 g and sodium bicarbonate 15 mEq. The pump flow was adjusted to maintain a cardiac index of  $2.4 \text{ L/min/m}^2$  and assessed by venous gases to maintain mixed venous saturation over 60%. Mean systemic arterial pressure was maintained between 50 and 70 mmHg with crystalloid (Ringer's lactate) and boluses of 50 to 200  $\mu\text{g}$  of neosynephrine (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA). The temperature was allowed to drift to  $36^\circ\text{C}$ . The heart was left beating empty and no aortic cross clamping or cardioplegia was used. Before weaning of the CPB, swine were rewarmed to  $38^\circ\text{C}$  (normal porcine temperature). After 90 min of CPB, mechanical ventilation and isoflurane anaesthesia were reinstituted and CPB was weaned. Normal circulation was restored for 60 min, at which time the animal was exsanguinated. The beating heart and the lungs were excised "en bloc" and immediately immersed in a cold modified Krebs-bicarbonate solution (composition in mmol/l: NaCl 118.3, KCl 4.7,  $\text{MgSO}_4$  1.2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2, glucose 11.1,  $\text{CaCl}_2$  2.5,  $\text{NaHCO}_3$  25, and ethylenediaminetetraacetic acid 0.026).

#### 2.2.3. GROUP 3: INHALED SILDENAFIL BEFORE CARDIOPULMONARY BYPASS ( $N = 6$ )

The same procedure was followed as in the CPB group (Group 2), except for administration of a 10-mg bolus of sildenafil (0.5 mg/kg) (Viagra, Pfizer, Sandwich, UK) diluted in 20 ml of buffer (0.038 mol/l sodium acetate); this latest was given via the endotracheal tube through a nebulizer during the 30-min period preceding the initiation of CPB. The dosage was based on review of the literature [13-15]. Sildenafil was given as sildenafil mesylate salt formulated for nebulizer administration. The drug was administered through a conventional in-line nebulizer kit (Salter Labs, Arvin, USA) connected to the inspiratory limb of the ventilator.

#### 2.2.4. GROUP 4: INHALED SILDENAFIL AFTER CARDIOPULMONARY BYPASS ( $N = 6$ )

The same procedure was followed as in the CPB group (Group 2), except for administration of a 10-mg bolus of sildenafil diluted in 20 ml of buffer given via the endotracheal tube through a nebulizer during 30 min following the weaning of CPB.

#### 2.2.5. GROUP 5: INTRAVENOUS SILDENAFIL BEFORE CARDIOPULMONARY BYPASS ( $N = 5$ )

The same procedure was followed as in the CPB group (Group 2) except for administration of a 10-mg bolus of sildenafil diluted in 20 ml of buffer given intravenously during a 30-min period preceding the initiation of CPB.

### 2.3. *Vascular reactivity studies*

Less than 10 min after "en bloc" excision, the heart was removed and the primary pulmonary artery dissected. Branches of second degree of pulmonary arteries were isolated and dissected free of connective and adventitial tissue and divided into rings (4 mm wide; 16 rings per animal). All rings were placed in organ chambers (Emka technologies Inc., Paris, France) filled with 20 ml of modified Krebs-bicarbonate solution continuously heated at 37°C and oxygenated with a carbogen mixture (95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>). The rings were suspended between two metal stirrups with the upper one connected to an isometric force transducer connected to a signal amplifier and then allowed to stabilize for 30 min. Data were collected with a biological signal data acquisition software (IOX 1.700; Emka technologies Inc., Paris, France). Each arterial ring was stretched to the optimal point of its active length-tension curve (4.0 g) as determined by measuring the contraction to potassium chloride (KCl; 60 mmol/l) at

different levels of stretch (data not shown). The maximal contraction of rings was then obtained with addition of potassium chloride (KCl 60 mmol/l). After stabilization, all baths were washed twice with modified Krebs-bicarbonate solution and indomethacin ( $10^{-5}$  mmol/l; to exclude production of endogenous prostanoids) was added in each bath. After 45 min of stabilization, phenylephrine (PE, range  $2 \times 10^{-7}$  mol/l to  $3 \times 10^{-6}$  mol/l) was added to obtain a contraction averaging 50% of the maximal contraction to KCl.

#### 2.3.1. ENDOTHELIUM-DEPENDENT RELAXATIONS

The NO-mediated relaxation pathway was studied by constructing concentration-response curves to acetylcholine (ACh,  $10^{-9}$  to  $10^{-5}$  mol/l) and to bradykinin (BK,  $10^{-12}$  to  $10^{-6}$  mol/l).

#### 2.3.2. ENDOTHELIUM-INDEPENDENT RELAXATIONS

At the end of the experiment, endothelium-independent relaxations were studied with the use of a bolus of  $10^{-5}$  mol/l sodium nitroprusside (SNP), a NO donor.

#### 2.4. *Study drugs*

All drugs were prepared daily. Acetylcholine, bradykinin, indomethacin, and SNP were obtained from Sigma Chemical Co. (Mississauga, ON, Canada). Phenylephrine was obtained from Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA). Sildenafil was obtained from Pfizer, (Sandwich, Kent, England).

### 2.5. Hemodynamic data

The jugular vein and carotid artery were cannulated to obtain a central venous line and arterial pressure respectively. A Swan-Ganz catheter (Edwards Lifesciences, Irving, CA, USA) was inserted through the jugular vein to measure wedge, central venous and pulmonary artery pressure and cardiac output.

### 2.6. Statistical analysis

All values are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Contractions to PE (phenylephrine) are expressed as a percentage of the maximal contraction to KCl (60 mmol/l). Relaxations are expressed as the percentage of the maximal contraction to PE for each ring. Two-way repeated analysis of variance (ANOVA) were performed to compare each point of the concentration-response curves between control and CPB rings. Statistical analysis was performed with the computer software S.A.S. (Instr Inc., Cary, NC, USA). A *p*-value less than 0.05 was considered statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. Contractions

The amplitude of the contractions to potassium chloride (60 mmol/l; an endothelium-independent agent), to phenylephrine and the concentration of PE needed to achieve the target level of contraction to KCl were not significantly different between groups (Table 1).

### 3.2. *Relaxations*

There was a statistically significant decrease of endothelium-dependent relaxations to ACh and to BK in the CPB group when compared to controls ( $p<0.05$ ). This endothelial dysfunction was prevented by the administration (intravenously or by inhalation) of sildenafil prior to or after CPB (Figs 1 and 2). All sildenafil groups achieved maximal relaxation greater than controls. No difference in relaxation to SNP was observed between groups with all rings achieving 100% relaxation.

### 3.3. *Hemodynamic data*

In the CPB untreated group, the mean pulmonary arterial pressure (mPAP) increased following CPB and reached statistical significance 30 min after weaning ( $p<0.05$ ) (Fig 3a). Administration of inhaled sildenafil prior to CPB prevented this statistically significant increase ( $p=0.37$ ) in mPAP. Intravenous sildenafil had the same effect. When given after the CPB, inhaled sildenafil decreased the mPAP. This decrease was more pronounced at 30 min of reperfusion (at the end of the nebulisation) but never reached statistical significance ( $p=0.24$ ).

No statistically significant hypotension was observed after the administration of sildenafil (intravenously or by inhalation). The only significant decrease in the mean arterial pressure (MAP) was observed in the group receiving inhaled sildenafil prior to CPB at the time of reperfusion (Fig 3b). The cardiac output was increased in all groups during reperfusion except for the inhaled sildenafil after CPB at 60 min of reperfusion ( $p=0.16$ ) (Fig 3c). No statistically significant tachycardia was noted with sildenafil administration either intravenously or by inhalation.

### 3.4. *Oxygenation*

Following weaning from CPB, in the CPB untreated group, the alveolo-arterial gradient was statistically significantly increased (Fig 3d). This was prevented by nebulisation of sildenafil after the CPB and by the intravenous administration: in the inhaled sildenafil after CPB group, this gradient was decreased 30 min after reperfusion ( $p<0.05$ ) and increased at 60 min ( $p<0.05$ ) whereas it was only significantly increased after 60 min of reperfusion in the intravenous group.

## 4. **Discussion**

The aim of the present study was to evaluate the effects of the use of sildenafil on the pulmonary artery endothelial function, hemodynamic profile and oxygenation following exposure to CPB as well as to determine the best timing for administration of the treatment. The major findings of this study are that: 1) Sildenafil administration, intravenous and inhaled (prior to or after CPB) prevents the occurrence of the pulmonary endothelial dysfunction after CPB; 2) Sildenafil prevents the increase in mPAP after CPB with a safe hemodynamic profile; 3) Nebulisation of sildenafil after CPB and intravenous administration prevent the increase in alveolo-arterial gradient secondary to CPB.

Postoperative pulmonary hypertension is a serious complication of cardiac surgery [16] which may increase right ventricular work and trigger right heart failure associated with a high mortality. Morita and colleagues demonstrated in a porcine model that CPB causes a significant increase in pulmonary vascular resistance and



depresses the right ventricular function by more than 50% [17]. During full CPB, pulmonary perfusion is decreased due to diversion of the systemic venous return to the aorta. The weaning of CPB completes the ischemia-reperfusion cycle which causes injury to the lungs [18] and further induces a significant decrease in endothelium-dependent relaxations to ACh. In our model, both  $G_i$  and  $G_q$  protein mediated pathways were altered (ACh and BK) upon reperfusion of the pulmonary tree after CPB.

#### 4.1. *Vascular reactivity*

In this model, CBP is associated with significant decreases in endothelium-dependent relaxations, suggesting the presence of an endothelial dysfunction. Since no significant differences in endothelium-independent relaxations to the exogenous NO donor SNP were observed, this suggests that the endothelial dysfunction is not due to an alteration of vascular smooth muscle cells, but is attributed to functional alterations of the signalling transduction mechanisms of the endothelial cells per se [19-20]. These alterations in the endothelial cell signalling pathway involve both  $G_i$  and  $G_q$  protein mediated relaxations, as seen by the rightward shift in the concentration-response curves to ACh and BK respectively. ACh induces vasoconstriction under resting conditions, and vasodilatation under conditions of elevated tone; NO pathway, as assessed by the  $G_i$  protein mediated agonist ACh, is preferentially damaged [17]. Indeed, Gagnon and colleagues have shown that reperfusion of the pulmonary tree after CPB induces a decrease in endothelium-dependent relaxations mediated by muscarinic receptors [21]. On the other hand, BK is an agonist that binds to  $B_2$  receptors which causes release of

NO in pulmonary endothelium but also stimulates prostacyclin release [22], resulting in vasodilatation independently of the preexisting vascular tone. However, all experiments in the present study were performed in presence of the cyclooxygenase inhibitor indomethacin to block the endogenous production of prostacyclin in order to focus on the NO pathway.

This study demonstrates the restoration of relaxations of the pulmonary rings with ACh and BK after sildenafil administration, through the inhaled and intravenous routes. This improvement can be explained by the inhibition of cGMP catabolism, which decreases calcium content in vascular smooth muscle cells, thus being less sensitive to the decreased NO content following CPB [23].

Moreover, the CPB-induced systemic inflammatory response produces massive amounts of reactive oxygen species [24] generated by pulmonary endothelial cells during reoxygenation after hypoxia [25]. Oxidative injury causes functional uncoupling of the receptor/G-protein complex specific to the NO signal transduction pathway [26] and of the eNOS by oxidation of an essential cofactor. This latest uncoupling leads to an increased production of free radicals at the expense of NO, accompanied by increased scavenging of NO by these radicals. The decrease in NO production and bioavailability caused by the presence of oxidative stress contributes to the endothelial dysfunction in pulmonary arteries following CPB. On the other hand, preservation of cGMP content by inhibition of its catabolism following sildenafil administration, explains the improvement in vascular relaxation.

#### 4.2. *Pulmonary artery pressure*

Since numerous risk factors for postoperative pulmonary hypertension have been identified, some subsets of patients could probably benefit from the prophylactic use of agents to lower the risk of developing this complication with its deleterious consequences. In the present study, mPAP was lowered by the use of inhaled sildenafil when administered at the end of the CPB. Following weaning from CPB, mPAP increased significantly compared to pre-bypass levels and decreased less than 1 min after initiation of the nebulisation of sildenafil. Upon termination of the sildenafil inhalation after 60 min of reperfusion, the mPAP slightly reincreased suggesting a possible clinical application to reverse pulmonary hypertension after cardiac surgery.

#### 4.3. *Oxygenation*

In this porcine model, exposure to CPB induced a significant increase of the alveolo-arterial gradient. Inhaled sildenafil, during reperfusion, prevented this increase during the duration of nebulisation. Animals presented severe desaturation immediately after weaning of CPB as in two swine with oxygen saturations less than 60% which was normalized less than 1 min after the beginning of the nebulisation. However, the preventive effect lasted only during the duration of the nebulisation, as seen with the increased alveolo-arterial gradient after 60 min of reperfusion (30 min after the cessation of the nebulisation).

The intravenous administration of sildenafil did not cause a significant decrease in the alveolo-arterial gradient contrary to the one observed with nebulisation post-CPB, and prevented the short rise (30 minutes) observed with CPB alone. The additional

hemodynamic benefit seen with nebulisation may come from that fact that, like NO [27], inhaled sildenafil diffuses rapidly across the alveolar-capillary membrane into the adjacent smooth muscle of pulmonary vessels causing vascular smooth muscle relaxation. Moreover, inhaled sildenafil has an impact exclusively on ventilated zone, improving the perfusion of these zones only whereas intravenous sildenafil is delivered into perfused zones that may not be ventilated, increasing the shunt.

Possible side effects of intravenous administration of type III phosphodiesterase inhibitors include hypotension and tachycardia, which can be hazardous during the post-operative period. Intravenous administration of sildenafil did not significantly decrease the mean systemic arterial pressure or induce tachycardia, showing a higher specificity for the pulmonary vasculature. Similarly, inhaled sildenafil did not induce systemic hypotension demonstrating a safe and favorable hemodynamic profile by increasing the cardiac output without significant tachycardia.

#### *4.4. Limitations*

The pharmacodynamics of the drug cannot be described extensively in the route of administration used. The dosages used in this study were extrapolated from literature and from clinical use: a dose response curve was not obtained to determine the optimal dose. Finally, this model used young, healthy 8 week-old Landrace swine which may not reflect the clinical situation of adult patients with long standing cardiac and pulmonary diseases. The absence of cardioplegic arrest also differs from clinical CPB use. Inhaled sildenafil may not have the same beneficial effects in patients with heart failure, coronary artery disease and preexisting pulmonary diseases and may be contraindicated in patients receiving concomitant nitrates.

## 5. Conclusion

Exposure to CPB is associated with occurrence of pulmonary endothelial dysfunction which contributes to clinically significant pulmonary hypertension and the potential for right ventricular failure with its attendant high mortality. The novel use presented in this study of a well known drug is of definite clinical interest. Inhaled sildenafil in the prophylaxis of pulmonary hypertension in the postoperative setting could be an additional tool to prevent this important clinical problem. Moreover, sildenafil was able to reverse pulmonary hypertension once established. Since the effect occurs and ceases rapidly, it could be used once the pulmonary hypertension is established or in prophylaxis with continuous nebulisation.

**Acknowledgement**

This work was supported by the Montreal Heart Institute Research Foundation and the Department of Surgery of the "Université de Montréal". The authors would like to thank Marie-Pierre Mathieu and Dr. Olivier Bouchot for their skillful technical assistance and Karine Tétreault for her statistical expertise.

## References

- [1] Kolff WJ, Effler DB, Groves LK, Hughes CR, McCormack LJ. Pulmonary complications of open-heart operations: their pathogenesis and avoidance. *Cleve Clin Q* 1958;25:65-83.
- [2] Wan S, LeClerc JL, Vincent JL. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass: mechanisms involved and possible therapeutic strategies. *Chest* 1997;112:676-692.
- [3] Davila-Roman VG, Waggoner AD, Hopkins WE, Barzilai B. Right ventricular dysfunction in low output syndrome after cardiac operations: assessment by transesophageal echocardiography. *Ann Thorac Surg* 1995;60:1081-1086.
- [4] Chen YF, Oparil S. Endothelial dysfunction in the pulmonary vascular bed. *Am J Med Sci* 2000;320:223-232.
- [5] Lamarche Y, Malo O, Thorin E, Denault A, Carrier M, Roy J, Perrault LP. Inhaled but not intravenous milrinone prevents pulmonary endothelial dysfunction following CPB. *J Thorac Cardiovasc Res* 2004;128:109-116.
- [6] Raja SG, Nayak SH. Sildenafil : emerging cardiovascular indications. *Ann Thorac Surg* 2004;78:1496-1506.
- [7] Medina P, Segarra G, Martinez-Leon JB, Vila JM, Aldasoro M, Otero E, Lluch S. Relaxation induced by cGMP phosphodiesterase inhibitors sildenafil and zaprinast in human vessels. *Ann Thorac Surg* 2000;70:1327-1331.
- [8] Trachte AL, Lobato EB, Urdaneta F, Hess PJ, Klodell CT, Martin TD, Staples ED, Beaver TM. Oral sildenafil reduces pulmonary hypertension after cardiac surgery. *Ann Thorac Surg* 2005;79:194-197.

- [9] Urdaneta F, Willert JL, Beaver T, Naik B, Kirby DS, Lobato EB. Effects of a new phosphodiesterase enzyme type V inhibitor (UK 343-664) versus milrinone in a porcine model of acute pulmonary hypertension. *Ann Thorac Surg* 2004;78:1433-1437.
- [10] Tsai BM, Turrentine MW, Sheridan BC, Wang M, Fiore AC, Brown JW, Meldrum DR. Differential effects of phosphodiesterase-5 inhibitors on hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary artery cytokine expression. *Ann Thorac Surg* 2006;81:272-278.
- [11] Zhao L, Mason NA, Morrell NW, Kojonazarov B, Sadykov A, Maripov A, Mirrakhimov MM, Aldashev A, Wilkins MR. Sildenafil inhibits hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 2001;104:424-428.
- [12] Michelakis E, Tymchak W, Lien D, Webster L, Hashimoto K, Archer S. Oral sildenafil is an effective and specific pulmonary vasodilator in patients with pulmonary arterial hypertension: comparison with inhaled nitric oxide. *Circulation* 2002;105:2398-2403.
- [13] Ishikura F, Beppu S, Hamada T, Khandheria BK, Seward JB, Nehra A. Effects of sildenafil citrate (Viagra) combined with nitrate on the heart. *Circulation* 2000;102:2516-2521.
- [14] Traverse JH, Chen YJ, Du R, Bache RJ. Cyclic nucleotide phosphodiesterase type 5 activity limits blood flow to hypoperfused myocardium during exercise. *Circulation* 2000;102:2997-3002.
- [15] Przyklenk K, Kloner RA. Sildenafil citrate does not exacerbate myocardial ischemia in canine model of coronary artery stenosis. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:286-292.
- [16] Riedel B. The pathophysiology and management of perioperative pulmonary hypertension with specific emphasis on the period following cardiac surgery. *Int Anesthesiol Clin* 1999;37:55-79.



- [17]Morita K, Ihnken K, Buckberg GD, Sherman MP, Ignarro LJ. Pulmonary vasoconstriction due to impaired nitric oxide production after cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1996;61:1775-1780.
- [18]Shafique T, Johnson R, Dai HB, Weintraub R, Sellke F. Altered pulmonary microvascular reactivity after total cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;106:479-486.
- [19]Gagnon J, Desjardins N, Malo O, Carrier M, Perrault LP. Mechanism of pulmonary artery endothelial dysfunction secondary to cardiopulmonary bypass. *Canadian Perfusion* 2001;11:8-16.
- [20]Liu SF, Barnes PJ. Role of endothelium in the control of pulmonary vascular tone. *Endothelium* 1994;2:11-33.
- [21]Fortier S, DeMaria RG, Lamarche Y, Malo O, Denault A, Desjardins F, Carrier M, Perrault LP. Inhaled prostacyclin reduces cardiopulmonary bypass-induced pulmonary endothelial dysfunction via increased cyclic adenosine monophosphate levels. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004;128:109-116.
- [22]McIntyre RC Jr, Mitchell MB, Campbell DN, Grover FL. Lung transplantation with cardiopulmonary bypass exaggerates pulmonary vasomotor dysfunction in the transplanted lung. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;109:212-6.
- [23]Wessel DL, Adatia I, Giglia TM, Thompson JE, Kulik TJ. Use of inhaled nitric oxide and acetylcholine in the evaluation of pulmonary hypertension and endothelial function after cardiopulmonary bypass. *Circulation*. 1993 Nov;88(5 Pt 1):2128-38.
- [24]Kirklin JK, McGiffin DC. Control of the inflammatory response in extended myocardial preservation of the donor heart. *Ann Thorac Surg* 1999;68:1978-1982.

- [25]Ratych R, Chuknyiska R, Bulkley G. The primary localization of free radical generation after anoxia/reoxygenation in isolated endothelial cells. *Surgery* 1987;102:122-131.
- [26]Seccombe J, Schaff H. Coronary artery endothelial function after myocardial ischemia and reperfusion. *Ann Thorac Surg* 1995;60:778-788.
- [27]Ichinose F, Roberts JD Jr, Zapol WM. Inhaled nitric oxide : a selective pulmonary vasodilator : current uses and therapeutic potential. *Circulation* 2004;109:3106-111.



### Figure Legends

- Figure 1 Rings of porcine pulmonary arteries with endothelium. X-axis: Log ACh (M). Y-axis: relaxation (% contraction to PE). PE: phenylephrine. Data expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  CPB versus control, & $p < 0.05$  inhaled sildenafil before CPB versus CPB, # $p < 0.05$  inhaled sildenafil after CPB versus CPB,  $\alpha p < 0.05$  IV sildenafil versus CPB.
- Figure 2 Rings of porcine pulmonary arteries with endothelium. X-axis: Log BK (M). Y-axis: relaxation (% contraction to PE). PE: phenylephrine. Data expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  CPB versus control, & $p < 0.05$  inhaled sildenafil before CPB versus CPB, # $p < 0.05$  inhaled sildenafil after CPB versus CPB,  $\alpha p < 0.05$  IV sildenafil versus CPB.
- Figure 3 Hemodynamic parameters at baseline, 30 and 60 minutes of perfusion: a) pulmonary arterial pressure, b) mean arterial pressure, c) cardiac output, and d) alveolo-arterial gradient. Data expressed as mean + SEM. \* $p < 0.05$  versus baseline.

Figure 1

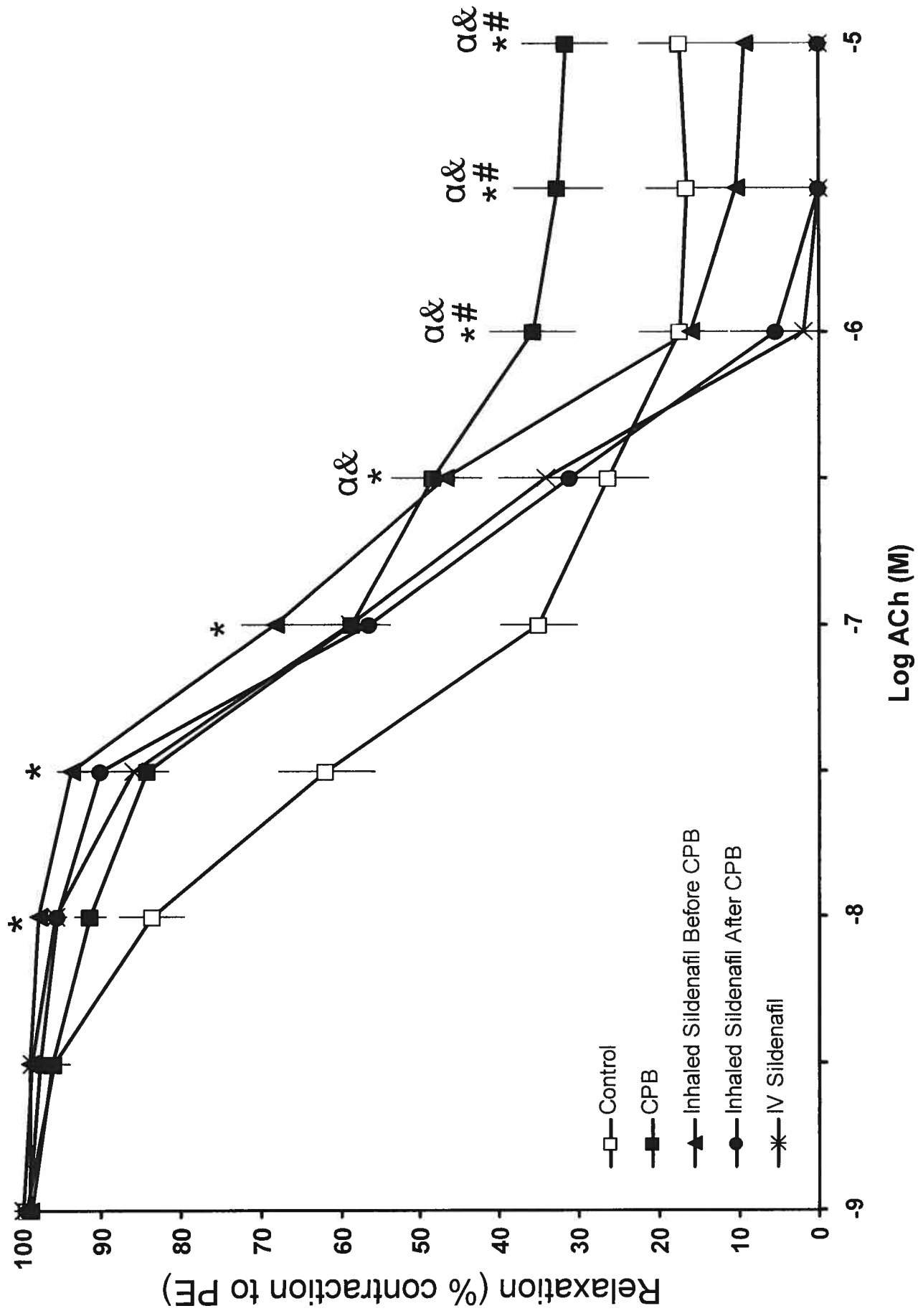


Figure 2

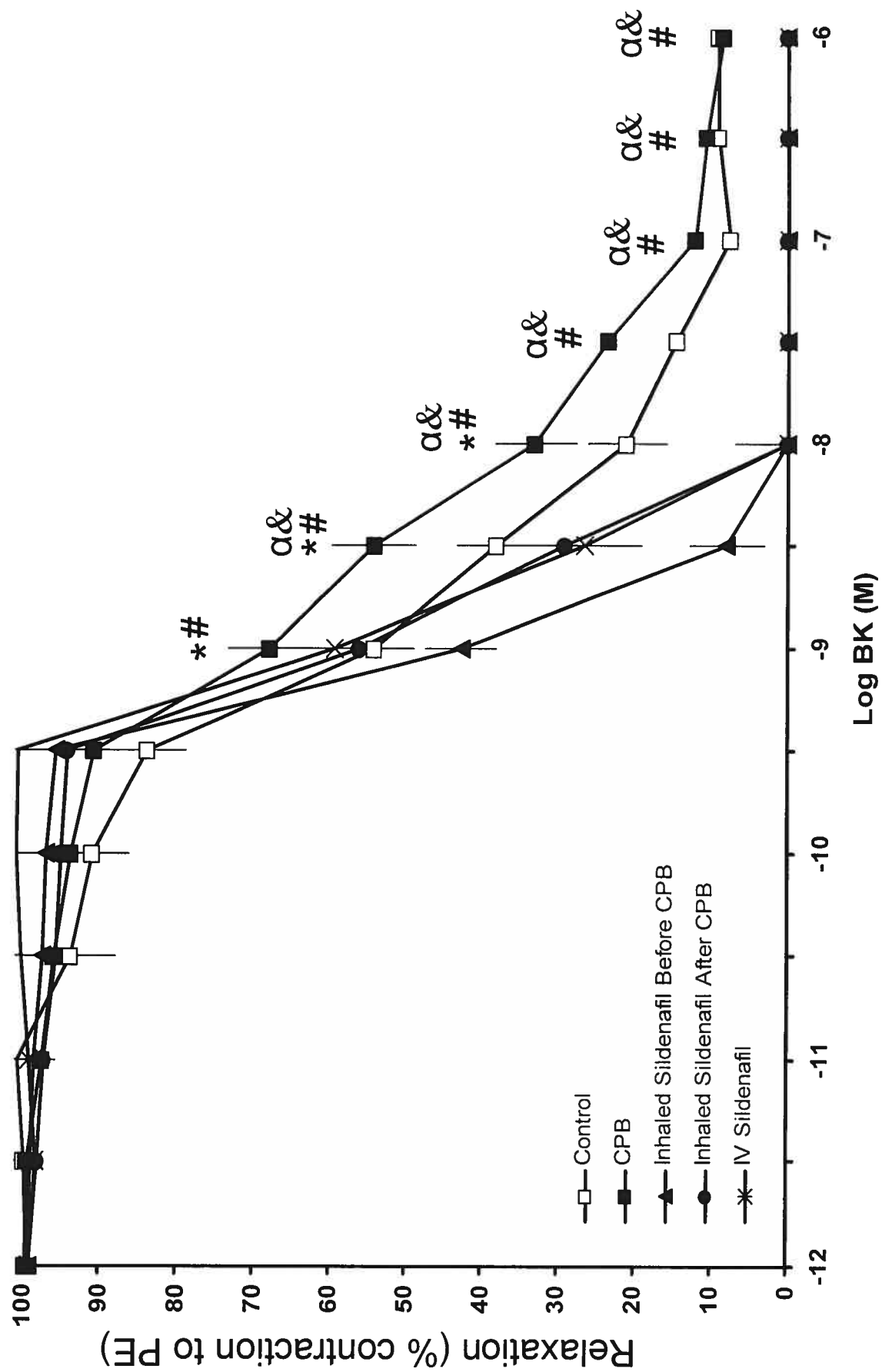


Figure 3a

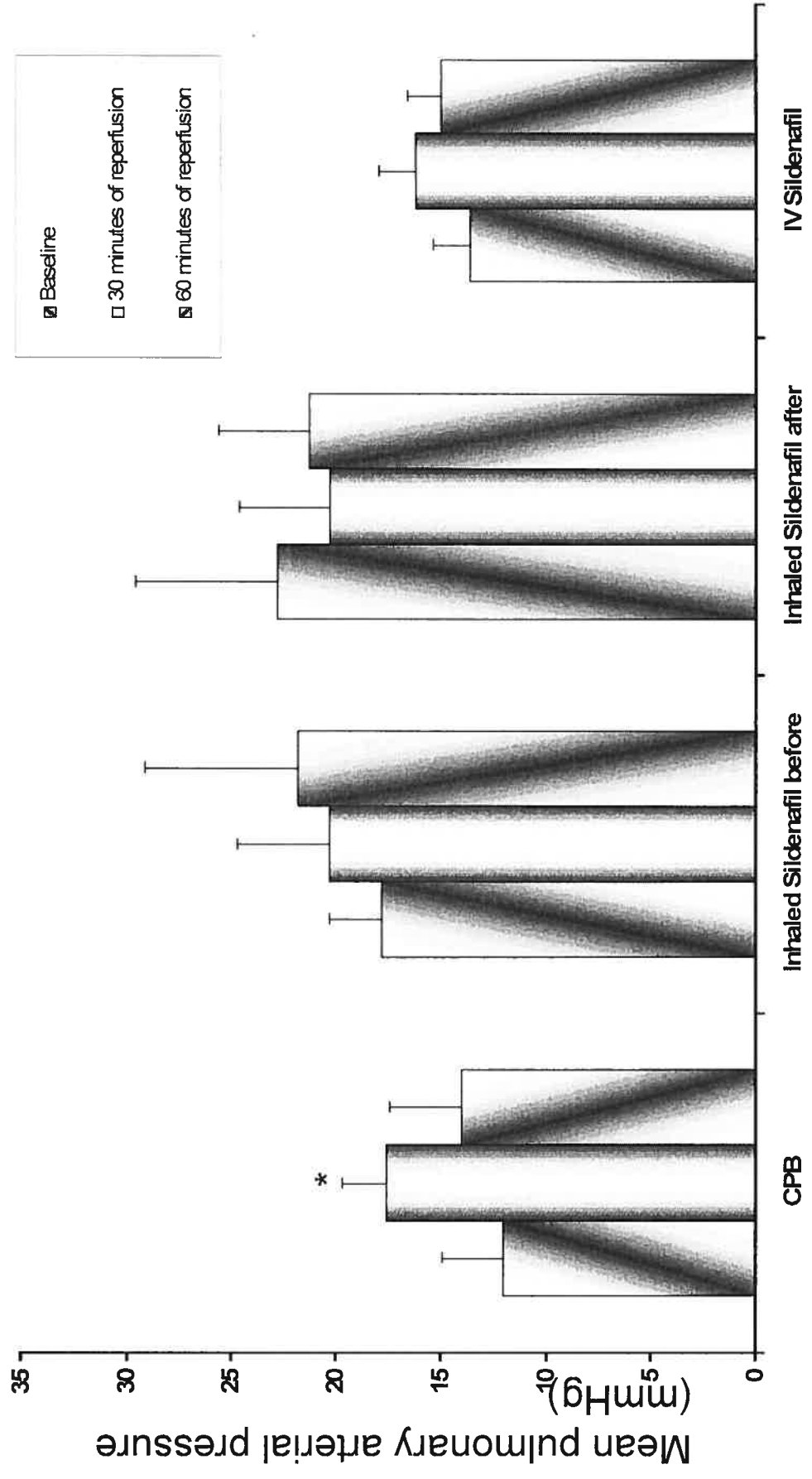


Figure 3b

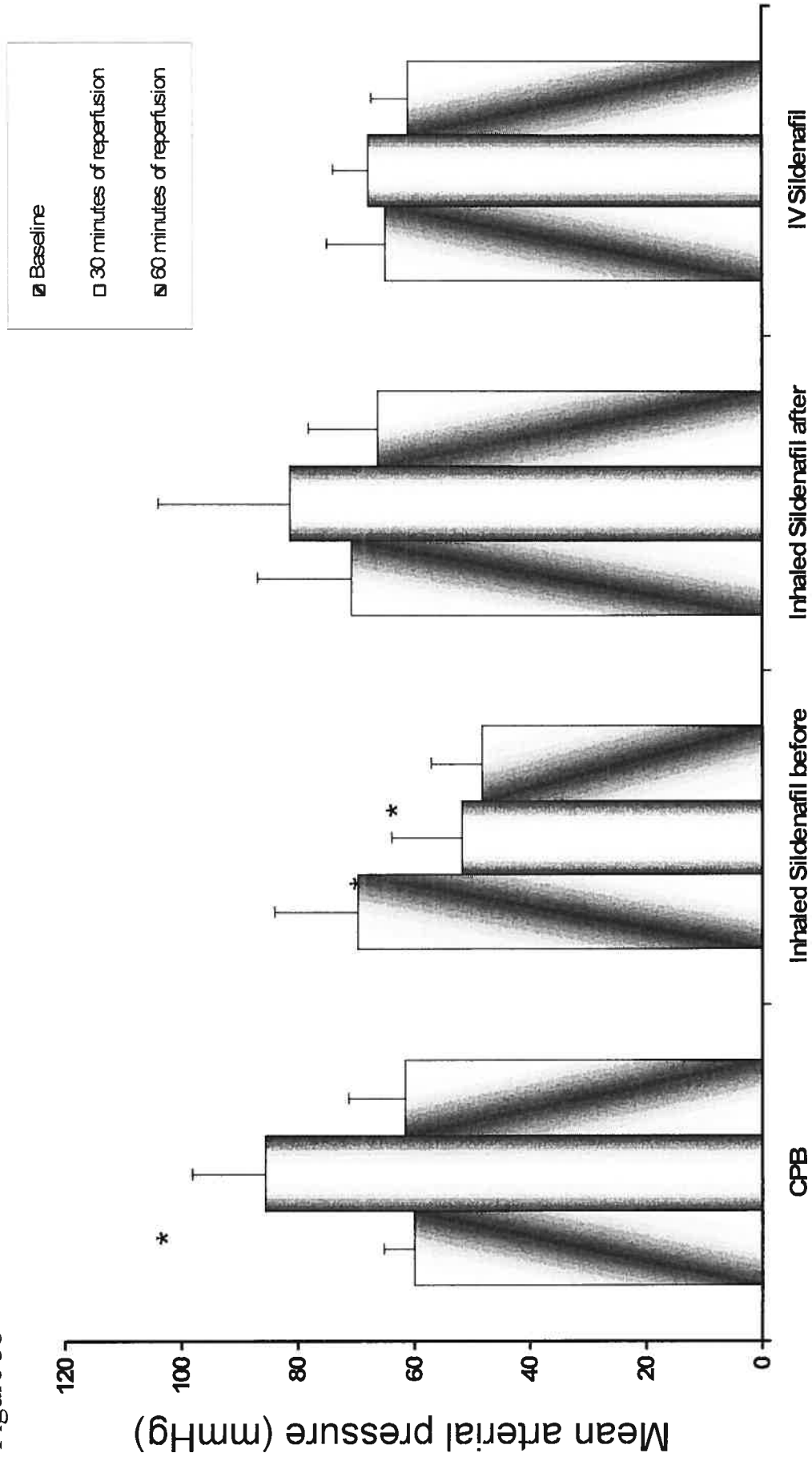




Figure 3c

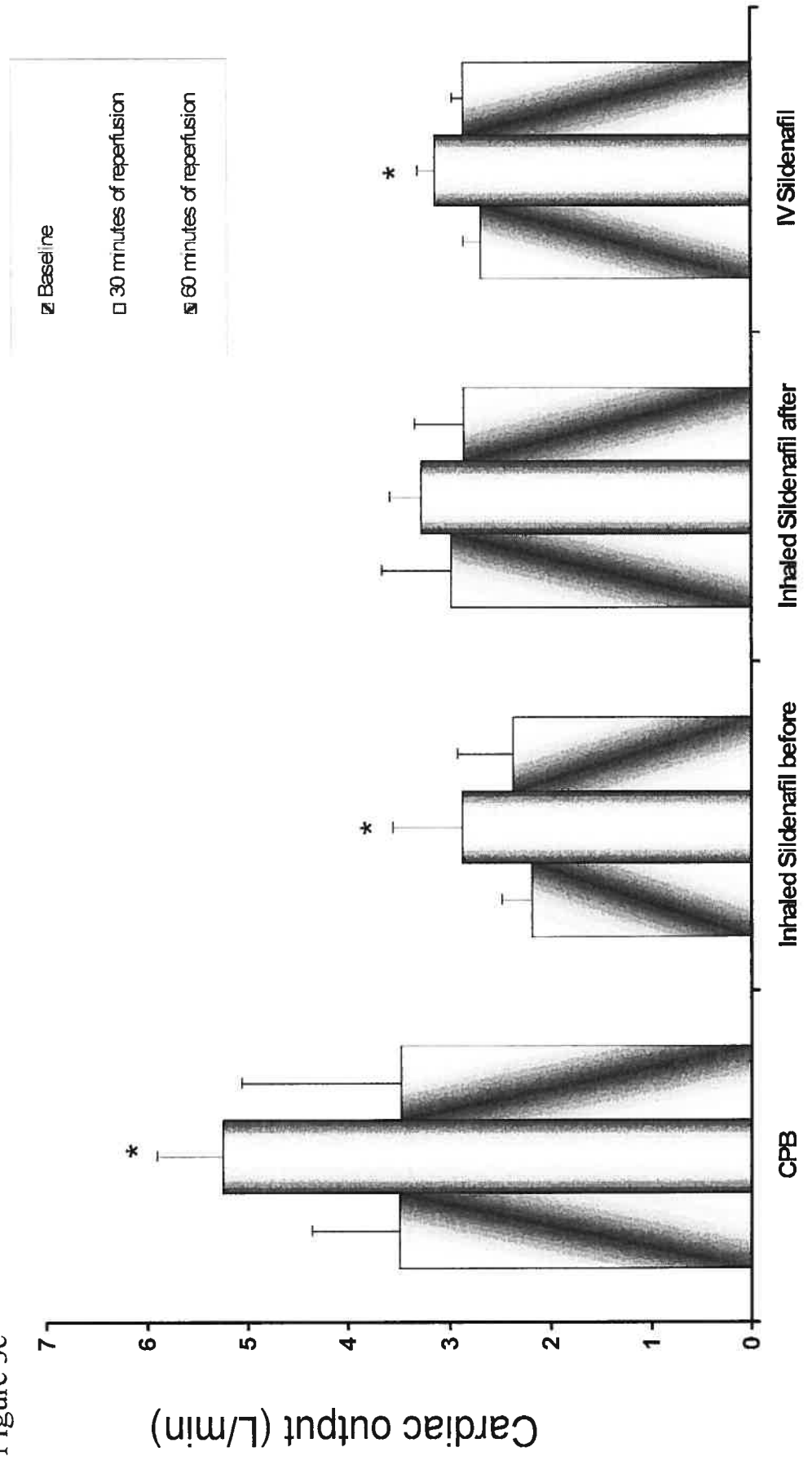
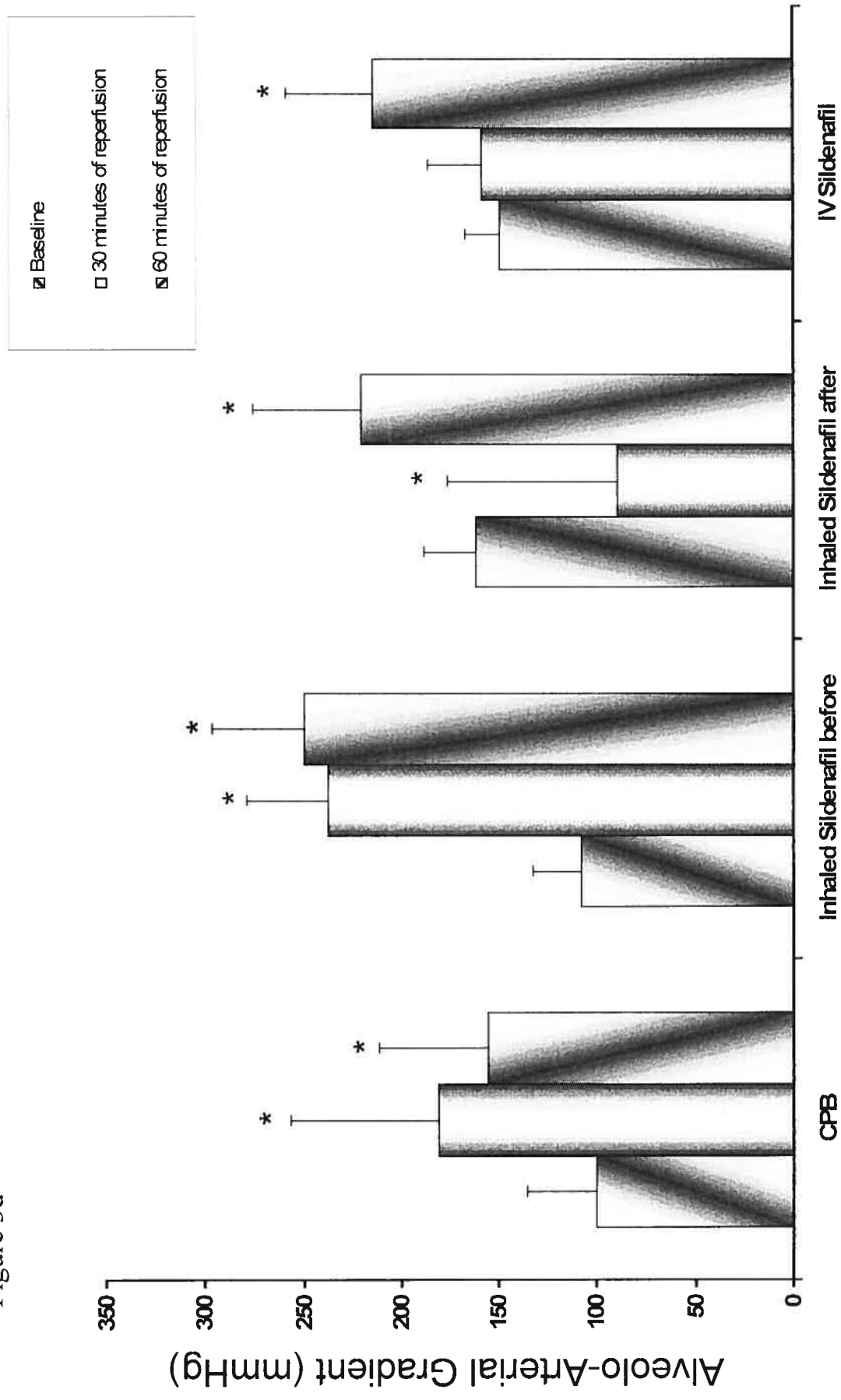


Figure 3d



## **DISCUSSION**

L'exposition à la CEC cause un cycle d'ischémie-reperfusion au niveau des artères pulmonaires qui s'ajoute à l'insulte chirurgicale. Ce cycle cause une dysfonction endothéliale artérielle pulmonaire secondaire à une baisse de production de facteurs relaxants sécrétés normalement par l'endothélium. Notamment, la production de NO semble être diminuée dans l'endothélium dysfonctionnel, ce qui entraîne une baisse de l'activité de la guanylate cyclase. Cette baisse d'activité enzymatique entraîne donc secondairement une baisse de la production de GMPc. Ce messager de la voie du NO induit normalement une relaxation du muscle lisse vasculaire. Cliniquement, cette dysfonction peut se traduire par une HTP suivant une augmentation significative des résistances artérielles pulmonaires (*Morita et al.*, 1996). Cette augmentation peut diminuer la fonction ventriculaire droite plus de 50% et être à l'origine d'une défaillance cardiaque droite, condition associée à un très mauvais pronostic. Il est donc important de ne pas négliger cet effet de la CEC puisqu'il influence grandement le devenir des patients opérés en chirurgie cardiaque. De plus, puisque certains facteurs de risque de développer une HTP en postopératoire ont été identifiés, nous pourrions cibler une population de patients pouvant bénéficier d'une prophylaxie.

Les options contemporaines pour pallier à ce problème sont limitées, coûteux, non spécifiques ou non utilisables. En effet, la ventilation pendant la CEC prévient la dysfonction endothéliale pulmonaire mais son utilisation est limitée par son côté encombrant. Le NO inhalé est coûteux et nécessite un équipement spécialisé. La milrinone intraveineuse cause une hypotension systémique. Le sildénafil par voie orale est absorbé de façon variable par l'estomac et l'intestin. De plus, aucune de ces modalités n'est approuvée par les autorités concernées.

Les objectifs du présent ouvrage étaient d'étudier une thérapie potentielle visant à améliorer les relaxations dépendantes de l'endothélium suivant la CEC par un renversement ou même une prévention du dommage endothélial artériel pulmonaire. Puisque l'effet terminal de la CEC sur l'endothélium est une baisse du GMPc produit, notre stratégie était d'en limiter la dégradation afin de compenser. Le GMPc étant dégradé par la phosphodiesterase de type V, le sildénafil, un inhibiteur de cette dernière était tout désigné. De plus, nous avons étudié l'effet du sildénafil sur l'oxygénation

suivant l'exposition à la CEC et le profil hémodynamique de son administration par voie intraveineuse et inhalée. Les principales trouvailles de cet ouvrage sont : 1) l'administration intraveineuse ou inhalée (avant ou après la CEC) de sildénafil prévient l'apparition d'une dysfonction endothéliale pulmonaire après la CEC ; 2) l'inhalation de sildénafil, avant ou après la CEC, prévient l'augmentation de la PAPm suivant la CEC sans hypotension systémique et 3) l'inhalation après la CEC et l'administration intraveineuse de sildénafil prévient l'augmentation du AaDO<sub>2</sub> suivant la CEC.

### *Relaxations dépendantes de l'endothélium*

Dans notre modèle, la CEC cause une diminution significative des relaxations dépendantes de l'endothélium, suggérant la présence d'une dysfonction endothéliale. Cependant, aucune différence n'a été observée en ce qui a trait aux relaxations indépendantes de l'endothélium au nitroprussiate, un donneur de NO. Cette dysfonction observée n'est donc pas due à une altération ou à une diminution de la sensibilité des cellules musculaires lisses vasculaires mais plutôt à une dysfonction des voies de signalisation cellulaires au niveau endothélial. Cette altération de la signalisation affecte les relaxations médiées par les voies impliquant les protéines Gi et Gq comme le démontre le déplacement vers la droite des courbes réponse à l'ACh et à la BK. La réponse inflammatoire induite par la CEC produit une quantité massive d'espèces réactives oxygénées (*Kirklin et McGiffin*, 1999) générées par les cellules endothéliales pulmonaires durant la réoxygénation après l'hypoxie (*Ratych et al.*, 1987). Cette insulte cause un découplage fonctionnel du complexe récepteur/protéine G spécifique à la voie de signalisation du NO (*Seccombe et Schaff*, 1995) et de la eNOS par oxydation de la BH<sub>4</sub>, un cofacteur nécessaire pour son activité (*Milstien et Katusic*, 1999). Le découplage augmentant la production de radicaux libres aux dépens du NO et la réaction entre ces deux produits entraîne une diminution de la production et de la biodisponibilité du NO qui explique la dysfonction endothéliale.

Dans le but d'éliminer la production endogène de PGI<sub>2</sub>, toutes nos expériences ont été effectuées en présence d'indométhacine, un inhibiteur de la cyclooxygénase, pour isoler la voie du NO. Ainsi, nous avons démontré que le sildénafil, qu'il soit administré par voie intraveineuse ou inhalée (avant ou après la CEC), a su rétablir les

relaxations des artères pulmonaires à l'ACh et à la BK. Cette propriété est due à la préservation du GMPc en inhibant sa dégradation ce qui diminue la concentration intracellulaire de calcium dans la cellule musculaire lisse vasculaire.

### *Pression artérielle pulmonaire*

Suivant le sevrage de la CEC, la PAPm augmente de façon significative comparativement au niveau pré-CEC. Lorsque le sildénafil était administré de façon intraveineuse, aucun effet sur la variation de la PAPm n'était noté. Lorsqu'administré par inhalation avant la CEC, le sildénafil inhibait l'augmentation significative de la PAPm après la CEC. Finalement, lorsqu'administré après la CEC, la PAPm diminuait par rapport à son niveau pré-CEC. L'effet du médicament sur la PAPm se voyait rapidement, de l'ordre de moins d'une minute, et cessait peu après l'arrêt de la nébulisation. Le sildénafil pourrait donc être utilisé en prophylaxie ou comme traitement lorsque l'HTP serait déjà établie.

### *Oxygénation*

Dans notre modèle, l'exposition à la CEC induit une augmentation significative du AaDO<sub>2</sub>, témoignant un déficit d'oxygénation. Lorsqu'administré par voie intraveineuse, le sildénafil prévenait cette augmentation. Cependant, l'effet plus bénéfique se voyait lorsque nous administrons le sildénafil par inhalation après la CEC et ne se voyait que pendant la nébulisation. Quelques animaux ont présenté un tableau de désaturation sévère (< 60%) suite au sevrage de la CEC, saturation qui fut normalisée moins d'une minute après le début de la nébulisation du sildénafil. La nébulisation ne durant que 30 minutes et la reperfusion avant le sacrifice de l'animal une heure, les animaux désaturaient la 2<sup>e</sup> demie-heure et décédait.

Les effets néfastes observés avec la milrinone, à savoir l'hypotension systémique et la tachycardie réflexe, n'ont pas été observés avec le sildénafil peu importe la voie d'administration, démontrant une plus grande spécificité pour l'arbre vasculaire pulmonaire. De plus, le sildénafil a su augmenter le débit cardiaque.

Nous croyons que pour avoir son effet bénéfique, le sildénafil doit diffuser rapidement à travers la membrane alvéolo-capillaire dans la cellule musculaire lisse vasculaire pulmonaire adjacente comme pour le NO (*Ichinose et al.*, 2004). De plus, l'avantage de la voie inhalée vient de la diminution du shunt, effet néfaste se produisant lorsqu'il y a perfusion de zones non ventilées. En effet, toutes les zones pulmonaires ne sont pas ventilées de façons égales. L'inhalation du sildénafil cible son effet seulement dans les zones ventilées. En vasodilatant ces zones, l'augmentation de la perfusion se fait surtout au niveau de zones ventilées, augmentant le match ventilation-perfusion.

### *Limitations*

La pharmacodynamique du sildénafil n'a pas été décrite extensivement, n'étant pas un but de cet ouvrage. De plus, les doses utilisées dans cette étude proviennent de l'extrapolation de la littérature et de l'utilisation clinique de cette médication. Nous n'avons pas obtenu une courbe dose-réponse pour déterminer la dose optimale.

Dans cette étude, notre modèle utilisait de jeunes porcs de 8 semaines en bonne santé, ne correspondant pas à la situation clinique, nos patients souffrant de maladies cardiaques et pulmonaires chroniques. L'effet du sildénafil pourrait ne pas avoir les mêmes effets bénéfiques chez les patients avec défaillance cardiaque, maladie coronarienne athérosclérotique ou maladie pulmonaire obstructive chronique. Il est de même contreindiqué chez les patients recevant déjà des nitrates.

## **CONCLUSION**



L'exposition à la CEC est associée à la survenue d'une dysfonction endothéliale pulmonaire qui contribue au développement d'une HTP cliniquement significative pouvant entraîner une défaillance ventriculaire droite, condition associée à un haut taux de mortalité. La nouvelle utilisation d'un médicament bien reconnu pour une autre indication est d'un intérêt clinique certain. L'inhalation du sildénafil en prophylaxie pourrait être un ajout important à notre arsenal thérapeutique chez les patients à risque de développer une HTP en postopératoire. De plus, ayant pu renverser une HTP déjà établie, il pourrait également servir pour traiter l'HTP chez les patients ne l'ayant pas reçu en prophylaxie. Comme projets futurs, pour valider notre hypothèse, il serait intéressant d'évaluer la fonction endothéliale au point de vue moléculaire en dosant le GMPc. Des études chez l'humain pourraient également être entreprises.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- Abe A, Karaki H. *Mechanisms underlying the inhibitory effect of dibutyl cAMP in vascular smooth muscle.* Eur J Pharmacol. 1992 ; 211:305-11.
- Allardice D, Yoshida S, Ashmore P. *The importance of microembolism in the pathogenesis of organ dysfunction caused by prolonged use of the pump oxygenator.* J Thorac Cardiovasc Surg. 1996 ; 52:706.
- Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn F. *Localization and function of angiotensin AT<sub>1</sub> receptors.* Am J Hypertens. 2000 ; 13:31S-8.
- Allen SW, Chatfield BA, Koppenhafer SA, Schaffer MS, Wolfe RR, Abman SH. *Circulating immunoreactive endothelin-1 in children with pulmonary hypertension : association with acute hypoxic pulmonary vasoreactivity.* Am Rev Respir Dis. 1993 ; 148:519-22.
- Andries LJ, Brutsaert DL, Sys SU. *Nonuniformity of endothelial constitutive nitric oxide synthase distribution in cardiac endothelium.* Circ Res. 1998 ; 82:195-203.
- Ashraf S, Bhattacharya K, Zacharias S et al. *Serum S100B release after coronary artery bypass grafting : roller versus centrifugal pump.* Ann Thorac Surg. 1998 ; 66:1958.
- Auch-Schwelk W, Katusic ZS, Vanhoutte PM. *Contractions to oxygen-derived free radicals are augmented in aorta of the spontaneously hypertensive rat.* Hypertension. 1989 ; 13:859-64.
- Balasubramaniam V, Maxey AM, Fouty BW, Abman SH. *Nitric oxide augments fetal pulmonary artery endothelial cell angiogenesis.* Am J Physiol – Lung cellular & molecular physiology. 2006 ; 290(6):L1111-6.
- Balligand JL, Ungureanu-Longrois D, Simmons WW, Pimental D, Malinski TA, Kapturczak M, Taha Z, Lowenstein CJ, Davidoff AJ, Kelly RA, Smith TW, Michel T. *Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes.* J Biol Mol. 1994 ; 269:27580-8.
- Balligand JL, Ungureanu-Longrois D, Simmons WW, Kobzik L, Lowenstein CJ, Lamas S, Kelly RA, Smith TW, Michel T. *Induction of NO synthase in rat cardiac microvascular endothelial cells by IL-1 $\beta$  and IFN- $\gamma$ .* Am J Physiol. 1995 ; 268:H1293-303.

Ballinger SW, Petterson C, Yan CN, Doan R, Burow DL, Young CG, Yakes M, Van Houten B, Ballinger CA, Freeman BA, Runge MS. *Hydrogen peroxide and peroxinitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells.* Circ Res. 2000 ; 86:960-6.

Barst RJ, Langedon D, Frost A et al. *Sitaxsentan, an ET<sub>A</sub> receptor antagonist, for the treatment of pulmonary arterial hypertension.* Am J Respir Crit Care. 2004 ; 169:441-7.

Barst RJ, Rich SA, Horn EM, McLaughlin VV, McFarlin J. *Clinical efficacy of sitaxsentan, an endothelin-A receptor antagonist, in patients with pulmonary arterial hypertension.* Chest. 2002 ; 121:1860-8.

Barton M, Haudenschild CC. *Endothelium and atherogenesis : Endothelial therapy revisited.* J Cardiovasc Pharmacol. 2001 ; 38(Suppl. 2):S23-S25.

Batenburg WW, de Vries R, Saxena PR, Jan Danser AH. *L-S-Nitrosothiols : endothelium-derived hyperpolarizing factor in porcine coronary arteries?* J Hypertens. 2004 ; 22:1927-36.

Baufreton C, Intractor L, Jansen PGM et al. *Inflammatory response to cardiopulmonary bypass using roller or centrifugal pump.* Ann Thorac Surg. 1999 ; 67:972.

Berges A, Van Nassauw L, Bosmans J, Timmermans JP, Vrints C. *Role of nitric oxide and oxidative stress in ischemic myocardial injury and preconditioning.* Acta Cardiol. 2003 ; 58:119-32.

Bjornsson J, Edwards WD. *Primary pulmonary hypertension : a histopathological study of 80 cases.* Mayo Clin Proc. 1985 ; 60:16-25.

Blackstone EH, Kirklin JW, Stewart RW et al. *The damaging effect of cardiopulmonary bypass.* In Wu KK, Roxy EC (eds). Prostaglandins in Clinical Medicine : Cardiovascular and Thrombotic Disorders. Chicago, Yearbook Medical Publishers. 1982 ; 355.

Blauth CI, Smith PL, Arnold JV et al. *Influence of oxygenator type on the prevalence and extent of micro-emboli retinal ischemia during cardiopulmonary bypass : assessment by digital imaging analysis.* J Thorac Surg. 1990 ; 96:61.

Boisclair MD, Lane DA, Philippou H et al. *Thrombin production, inactivation and expression during open heart surgery measured by assays for activation fragments including a new ELISA for prothrombin Fragment F1 +2*. Thromb Haemost. 1993 ; 70:253.

Boulanger CL, Tanner FC, Bea ML, Werner A, Hahn AWA, Lüscher TF. *Oxidized low density protein induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium*. Circ Res. 1992 ; 70:1191-7.

Boulanger CM, Vanhoutte PM. *G protein and endothelium-dependant relaxations*. J Vasc Res. 1997 ; 34:175-85.

Bowen FW, Edmunds LH Jr. *Coagulation, anticoagulation, and the interaction of blood and artificial surfaces*. In Zwischenberger JB, Steinhorn RH, Bartlett RH (eds). ECMO : Extracorporeal Cardiopulmonary Support in Critical Care. Extracorporeal Life Support Organization Publication. 2000.

Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH. *Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase*. Nature. 1991 ; 351:714-8.

Brister SJ, Ofosu FA, Buchanan MR. *Thrombin generation during cardiac surgery : is heparin the ideal anticoagulant?* Thromb Haemost. 1993 ; 70:259.

Brooker RF, Brown WR, Challa VR. *Brain micro embolic associated with cardiopulmonary bypass : a histologic and magnetic resonance imaging study*. Ann Thorac Surg. 1995 ; 59:1304.

Bukoski RD, Bergman C, Gairard A, Stoclet JC. *Intracellular  $Ca^{2+}$  and force determined simultaneously in isolated resistance arteries*. Am J Physiol. 1989 ; 257:H1728-35.

Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. *EDHF : bringing the concepts together*. TRENDS in Pharmacological Sciences. 2002 ; 23(8):374-80.

Cai H, Griendling KK, Harrison DG. *The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases*. TRENDS in Pharmacological sciences. 2003 ; 24(9):471-8.

Caldwell PR, Seegal BC, Hsu KC, Das M, Soffer RL. *Angiotensin-converting enzyme : vascular endothelial localization*. Science. 1976 ; 191:1050-1.

Campbell WB, Gauthier KM. *What is new in endothelium-derived hyperpolarizing factors?* Curr Opin Nephrol Hypertens Res. 2002 ; 11:177-83.

Cavarocchi NC, Schaff HV, Orszulak TA et al. *Evidence for complement activation by protamin-heparin interaction after cardiopulmonary bypass*. Surgery. 1985 ; 98:525.

Channick RN, Simonneau G, Sitbon O et al. *Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension : a randomized placebo-controlled study*. Lancet. 2001 ; 358:1119-23.

Chauchan SD, Nilsson H, Ahluwalia A, Hobbs AJ. *Release of C-type natriuretic peptide accounts for the biological activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor*. Proc Natl Acad Sci USA. 2003 ; 100:1426-31.

Chen YF, Oparil S. *Endothelial dysfunction in the pulmonary vascular bed*. Am J Med Sci. 2000 ; 320:223-32.

Chenoweth DE, Cooper SW, Hugli TE et al. *Complement activation during cardiopulmonary bypass : evidence for generation of C3a and C5a anaphylatoxins*. N Engl J Med. 1981 ; 304:497.

Chenoweth DE, Hugli TE. *Demonstration of specific C5a receptor on human polymorphonuclear leukocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1978 ; 75:3943.

Christman BW, McPherson CD, Newman JH et al. *An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension*. N Eng J Med. 1992 ; 327:70-5.

Chung JH, Gikakis N, Drake TA et al. *Pericardial blood activates the extrinsic coagulation pathway during clinical cardiopulmonary bypass*. Circulation. 1996 ; 93:2014.

Clark RE, Beauchamp RA, Magrath RA et al. *Comparison of bubble and membrane oxygenators in short and long term perfusion*. J Thorac Cardiovasc Surg. 1979 ; 78:655.

Coleman RA, Smith WL, Narumiya S. *International union of pharmacology classification of prostanoid receptors : properties, distribution and structure of the receptors and their subtypes*. Pharmacol Rev. 1994 ; 46:205-29.

Cool CD, Rai PR, Yeager ME et al. *Expression of human herpesvirus 8 in primary pulmonary hypertension*. N Eng J Med. 2003 ; 349:1113-22.

Cox CP, Linden J, Said SI. *VIP elevates platelet cyclic AMP (cAMP) levels and inhibits in vitro platelet activation induced by platelet-activating factor (PAF)*. Peptides. 1984 ; 5:325-8.

Craddock PR, Fehr J, Grigham KL et al. *Complement and leukocyte-mediated pulmonary dysfunction in hemodialysis*. N Engl J Med. 1977 ; 296:769.

Davila-Roman VG, Waggoner AD, Hopkins WE, Barzilai B. *Right ventricular dysfunction in low output syndrome after cardiac operations: assessment by transesophageal echocardiography*. Ann Thorac Surg. 1995 ; 60:1081-6.

Delpy E, Coste H, Gouville AC. *Effects of cyclic GMP elevation on isoprenaline-induced increase in cyclic AMP and relaxation in rat aortic smooth muscle : role of phosphodiesterase 3*. Br J Pharmacol. 1996 ; 119:471-8.

De Mey JG, Vanhoutte PM. *Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall : importance of the endothelium*. Circ Res. 1982 ; 5:439-47.

Denault AY, Bussi res J, Carrier M, Mathieu P and the SDB Study Group. *The importance of difficult separation from cardiopulmonary bypass : The Montreal and Quebec Heart Institute experience*. Exp Clin Cardiol. 2006 ; 11:37.

Denault AY, Chaput M, Couture P, Hebert Y, Haddad F, Tardif JC. *Dynamic right ventricular outflow tract obstruction in cardiac surgery*. J Thorac Cardiovasc Surg. 2006<sup>1</sup> ; 132:43-9.

De Witt DL, Day JS, Sonnenburg WK, Smith WL. *Concentrations of prostaglandin endoperoxide synthase and prostaglandin I<sub>2</sub> synthase in the endothelium and smooth muscle of bovine aorta*. J Clin Invest. 1983 ; 72:1882-8.

Ding H, Triggle CR. *Contribution of EDHF and the role of potassium channels in the regulation of vascular tone.* Drug Dev Res. 2003 ; 58:81-9.

Dodrill FD, Hill E, Gerish RA, Johnson A. *Pulmonary valvuloplasty under direct vision using the mechanical heart for a complete bypass of the right heart in a patient with congenital pulmonary stenosis.* J Thorac Surg. 1953 ; 25:584.

Doolan LA, Jones EF, Kalman J, Buxton BF, Tonkin AM. *A placebo-controlled trial verifying the efficacy of milrinone in weaning high-risk patients from cardiopulmonary bypass.* J Cardiothorac Vasc Anesth. 1997 ; 11:37-41.

Dorer H, Triggle CR. *Contribution of EDHF and the role of potassium and properties of angiotensin-converting enzyme from hog lung.* Circ Res. 1972 ; 31:356-66.

Downing SW, Edmunds LH Jr. *Release of vasoactive substances during cardiopulmonary bypass.* Ann Thorac Surg. 1992 ; 54:1236.

Driessen JJ, Fransen G, Rondelez L et al. *Comparison of the standard roller pump and a pulsatile centrifugal pump for extracorporeal circulation during routine coronary artery bypass grafting.* Perfusion. 1991 ; 6:303.

Dupuis J. *Endothelin receptor antagonists and their developing role in cardiovascular therapeutics.* Can J Cardiol. 2000 ; 16(7):903-10.

Dzau VJ. *Multiple pathways of angiotensin production in the blood vessel wall : evidence, possibilities and hypothesis.* J Hypertens. 1989 ; 7:933-6.

Dzau VJ. *Short and long term determinants of cardiovascular function and therapy : contributions of circulating and tissue rennin-angiotensin systems.* J Cardiovasc Pharmacol. 1989<sup>1</sup> ; 14(Suppl 4):S1-5.

Edmunds LH Jr, Ellison N, Colman RW et al. *Platelet function during open heart surgery : comparison of the membrane and bubble oxygenators.* J Thorac Cardiovasc Surg. 1982 ; 83:805.



Edmunds LH Jr, Saxena NH, Hillyer P, Wilson TJ. *Relationship between platelet count and cardiomy suction return*. Ann Thorac Surg. 1978 ; 25:306.

Ekker M, Tronik D, Rougeon F. *Extra-renal transcription of the rennin genes in multiple tissues of mice and rats*. Proc Natl Acad Sci USA. 1989 ; 86:5155-8.

Eldor A, Falcone DJ, Hajjar DP, Minick CR, Weksler BB. *Recovery of prostacyclin production by de-endothelialized rabbit aorta : critical role of the neointimal smooth muscle*. J Clin Invest. 1981 ; 67:735-41.

Elgebaly SA, Hashmi FH, Houser SL et al. *Cardiac-derived neutrophil chemotactic activating factors : detection in coronary sinus effluents of patients undergoing myocardial revascularisation*. J Thorac Cardiovasc Surg. 1992 ; 103:952.

Ellis A, Triggle CR. *Endothelium-dependant reactive species : their relationship to endothelium-dependant hyperpolarization and the regulation of vascular tone*. Can J Physiol Pharmacol. 2003 ; 81:1013-28.

Ember JA, Jagels MA, Hugli TE. *Characterization of complement anaphylotoxins and their biological responses*. In Volankis JE, Frank MM (eds) : The human complement system in health and disease. New York. Marcel Dekker. 1998 ; 241.

Fantone JC. *Cytokines and neutrophils : neutrophils derived cytokines and the inflammatory response*. In Remick DG, Friedland JS (eds). Cytokines in Health and Disease, 2<sup>nd</sup> ed. New York, Marcel Dekker. 1997 ; 373.

Farber HW, Loscalzo J. *Pulmonary arterial hypertension*. New Eng J Med. 2004 ; 351:1655-65.

Farmer JA, Torre-Amione G. *The renin angiotensin system as a risk factor for coronary artery disease*. Curr Atheroscler Rep. 2001 ; 3:117-24.

Feletou M, Vanhoutte PM. *Endothelium-derived hyperpolarizing factor*. Clin Exp Pharmacol Physiol. 1996 ; 23:1082-90.

Feron O, Dessy C, Opel DJ, Arstall MA, Kelly RA, Michel T. *Modulation of the endothelial nitric-oxide synthase-caveolin interaction in cardiac myocytes.* J Biol Chem. 1998 ; 273(46):30249-54.

Fishman AP. *Endothelium. A distributed organ of diverse capabilities.* Ann N Y Acad Sci. 1982 ; 401:1-8.

Fissthaller B, Hinsch N, Chataigneau T. *Nifedipine increases cytochrome P4502C expression and endothelium-derived hyperpolarizing factors and converting enzyme inhibition.* Am J Cardiol. 1995 ; 76:E3-12.

Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, Potente M, Harder DR, Fleming I, Busse R. *Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries.* Nature. 1999 ; 272:C737-43.

Flavahan NA et PM Vanhoutte. *Endothelial cell signaling and endothelial dysfunction.* Am J Hypertens. 1995 ; 8:28S-41S

Fortier S, Demaria R, Malo O et al. *Inhaled prostacyclin reduces cardiopulmonary bypass-induced pulmonary endothelial dysfunction via increased cyclic-AMP levels.* J Thorac Cardiovasc Surg. 2004, Jul ; 128(1):109-16.

Fukami MH, Holmsen H, Kowalska A, Niewiarowski S. *Platelet secretion.* In Colman RW, Hirsh J, Marder VJ et al (eds) : Hemostasis and thrombosis : basic principles and practice. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. 2001 ; 559.

Fung M, Loubser PG, Ündar A et al. *Inhibition of complement, neutrophils and platelets activation by an anti-factor D monoclonal antibody in simulated cardiopulmonary bypass circuits.* J Thorac Cardiovasc Surg. 2001 ; 122:113.

Funk CD. *Platelet eicosanoids.* In Colman RW, Hirsh J, Marder VJ et al (eds) : Hemostasis and thrombosis : basic principles and practice. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. 2001 ; 533.

Furchgott RF, Vanhoutte PM. *Endothelium-derived relaxing and contracting factors.* FASEB J. 1989 ; 3:2007-18.

Furchgott RF, Zawadzki JV. *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. Nature. 1980; 288:373-6.

Fuster V, Steele PM, Edwards WD, Gersh BJ, McGoon MD, Frye RL. *Primary pulmonary hypertension : natural history and the importance of thrombosis*. Circulation. 1984 ; 70:580-7.

Gagnon J, Malo O, Desjardins N et al. *Ventilation and NO inhalation prevent pulmonary endothelial dysfunction due to cardiopulmonary bypass*. Presented at the 37<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Thoracic Surgeons, New Orleans, LA. Jan 29-31, 2001.

Gaine SP, Rubin LJ. *Primary pulmonary hypertension*. Lancet. 1998 ; 352:719-25.

Gerber JG, Voelkel N, Nies AS, McMurtry IF, Reeves JT. *Moderation of hypoxic vasoconstriction by infused arachidonic acid : role of PGI<sub>2</sub>*. J Appl Physiol. 1980 ; 49:107-12.

Giaid A, Saleh D. *Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension*. N Eng J Med. 1995 ; 333:214-21.

Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D et al. *Expression of endothelin-1 in lungs of patient with pulmonary hypertension*. N Engl J Med. 1993 ; 328:1732-9.

Gibbons GH. *Cardioprotective mechanisms of ACE inhibition. The angiotensin II-nitric oxide balance*. Drugs. 1997 ; 54 (Suppl 5):1-11.

Gibbon JH Jr. *Artificial maintenance of circulation during experimental occlusion of the pulmonary artery*. Arch Surg. 1937 ; 34:1105.

Gohlke P, Pees C, Unger T. *AT<sub>2</sub> receptor stimulation increases aortic cyclic GMP in SHRSP by a kinin-dependant mechanism*. Hypertension. 1998 ; 31:349-55.

Goldstein S, Czapski G. *The reaction of NO with O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : a pulse radiolysis study*. Free Radic Biol Med. 1995 ; 19:505-10.

Gorman RC, Ziats NP, Gikakis N et al. *Surface-bound heparin fails to reduce thrombin formation during clinical cardiopulmonary bypass*. J Thorac Cardiovasc Surg. 1996 ; 111:1.

Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. *Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells*. Circ Res. 1994 ; 74:1141-8.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. *NAD(P)H oxidase : role in cardiovascular biology and disease*. Circ Res. 2000 ; 86:494-501.

Griffin S, Pugsley W, Treasure T. *Microembolism during cardiopulmonary bypass : a comparison of bubble oxygenator with arterial line filter and membrane oxygenator alone*. Perfusion. 1991 ; 6:99.

Griffith TM. *Endothelium-dependant smooth muscle hyperpolarization : do gap junctions provide an unifying hypothesis?* Br J Pharmacol. 2004 ; 141:881-903.

Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM. *Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus. Role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase*. Circulation. 2002 ; 105:1656-62.

Haché M, Denault A, Bélisle S et al. *Inhaled epoprostenol and pulmonary hypertension before cardiac surgery*. J Thorac Cardiovasc Surg. 2003 ; 125:642-9.

Halushka PV, Mais DE, Mayeux PR, Morinelli TA. *Thromboxane, prostaglandin and leukotriene receptors*. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1989 ; 29:213-39.

Hammerschmidt DE, Stroncek DF, Bowers TK et al. *Complement activation and neutropenia during cardiopulmonary bypass*. J Thorac Cardiovasc Surg. 1981 ; 81:370.

Haraldsson A, Kieler-Jensen N, Ricksen SE. *The additive pulmonary vasodilatory effects of inhaled prostacyclin and inhaled milrinone in postcardiac surgery patients with pulmonary hypertension*. Anesth Analg. 2001 ; 93:1439-45.

Hawrylowicz CM, Santoro AS, Platt FM, Unanue ER. *Activated platelets express IL-1 activity*. J Immunol. 1989 ; 143:4015.

Hayashi Y, Sawa Y, Ohtake S, Fukuyama N, Nakazawa H, Matsuda H. *Peroxynitrite formation from human myocardium after ischemia-reperfusion during open heart operation.* Ann Thorac Surg. 2001 ; 72:571-6.

Herve P, Drouet L, Dosquet C et al. *Primary pulmonary hypertension in a patient with a familial platelet storage pool disease : role of serotonin.* Am J Med. 1990 ; 89:117-20.

Herve P, Launay JM, Scrobohaci ML et al. *Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension.* Am J Med. 1995 ; 99:249-54.

Higgenbottam T, Wheeldon D, Wells F, Wallwork J. *Long term treatment of primary pulmonary hypertension with continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin).* Lancet. 1984 ; 1:1046-7.

Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Maheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl RAK, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Forstermann U, Munzel T. *Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus.* Circ Res. 2001 ; 88:e14-e22.

Hink U, Oelze M, Kolb P, Bachschmid K, Zou MH, Daiber A, Mollnau H, August M, Baldus S, Tsimlingas N, Walter U, Ulrich V, Münzel T. *Role for peroxynitrites in the inhibition of prostacyclin synthase in nitrate tolerance.* J Am Coll Cardiol. 2003 ; 42:1826-34.

Hirata Y, Takagi Y, Marumo F. *Endothelin is a potent mitogen for rat vascular smooth muscle cells.* Atherosclerosis. 1989 ; 78:225-8.

Hoeper MM, Schwarze M, Ehlerding S et al. *Long term treatment of primary pulmonary hypertension with aerosolized iloprost, a prostacyclin analogue.* N Engl J Med. 2000 ; 342:1866-70.

Hoffman TM, Wernovsky G, Atz AM, Kulik TJ, Nelson DP, Chang AC, Bailey JM, Akbary A, Kocsis JF, Kaczmarek R, Spray TL, Wessel DL. *Efficacy and safety of milrinone in preventing low cardiac output syndrome in infants and children after corrective surgery for congenital heart disease.* Circulation. 2003 ; 107:996-1002.

Ichinose F, Erana-Garcia J, Hromi J et al. *Nebulized sildenafil is a selective pulmonary vasodilator in lambs with acute pulmonary hypertension*. Crit Care Med. 2001 ; 29(5):1000-5.

Ichinose F, Roberts JD Jr, Zapol WM. *Inhaled nitric oxide : a selective pulmonary vasodilator : current uses and therapeutic potential*. Circulation. 2004 ; 109:3106-111.

Irani K. *Oxidant signalling in vascular growth, death and survival : a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenesis and apoptotic signalling*. Circ Res. 2000 ; 87:179-83.

Iwagaki T, Irie J, Ijichi K, Uratsuji Y. *The effects of milrinone on hemodynamics in patients undergoing cardiac surgery*. Masui. 2001 ; 50:360-4.

Jacobi C. *Ein betrag zur technik der kunstlichen durchblutung uberlebender organe*. Arch Exp Pathol (Leipzig). 1895 ; 31:330.

Jaffe EA. *Endothelial cell structure and function*. In Hoffman R, Benz EJ Jr, Shattil SJ et al. (eds) : Hematology. New York, Churchill Livingstone. 1991 ; 1198.

Josephson RA, Silverman HS, Lakatta EG, Stern MD, Zweier JL. *Study of the mechanisms of hydrogen peroxide and hydroxyl free-radical-induced cellular injury and calcium overload in cardiac myocytes*. J Biol Chem. 1991 ; 266(4):2354-61.

Kappelmayer J, Bernabei A, Edmunds LH Jr et al. *Tissue factor is expressed on monocytes during simulated extracorporeal circulation*. Circ Res. 1993 ; 72:1075.

Kawashima M, Nakamura T, Schneider S et al. *Iloprost ameliorates ischemia-reperfusion injury by reduction of endothelin-1 release*. J Heart Lung Transplant. 2002 ; 21(1):133.

Kikura M, Levy JH, Michelsen LG, Shanewise JS, Bailey JM, Sadel SM, Szlam F. *The effect of milrinone on hemodynamics and left ventricular function after emergence from cardiopulmonary bypass*. Anesth Analg. 1998 ; 81:782-4.

Kilbridge PM, Mayer JE, Newburger JW et al. *Induction of intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin mRNA in heart and skeletal muscle of pediatric patients undergoing cardiopulmonary bypass*. J Thorac Cardiovasc Surg. 1994 ; 107:1183.

Kim JH, Ham BM, Kim YL, Bahk JH, Ryu HG, Jeon YS, Kim KB. *Prophylactic milrinone during OPCAB of posterior vessels: implication in angina patients taking beta-blockers.* Eur J Cardiothorac Surg. 2003 ; 24:770-6.

Kinlay S, Ganz P. *Role of endothelial dysfunction in coronary artery disease and implications for therapy.* Am J Cardiol. 1997 ; 86(Suppl. III):III12-19.

Kirklin JK, McGiffin DC. *Control of the inflammatory response in extended myocardial preservation of the donor heart.* Ann Thorac Surg. 1999 ; 68:1978-82.

Kirklin JK, Westaby S, Blackstone EH et al. *Complement and the damaging effects of cardiopulmonary bypass.* J Thorac Cardiovasc Surg. 1983 ; 86:845.

Kojda G, Harrison D. *Interaction between NO and reactive oxygen species : pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure.* Cardiovasc Res. 1999 ; 43:562-71.

Kolff WJ, Effler DB, Groves LK, Hughes CR, McCormack LJ. *Pulmonary complications of open-heart operations: their pathogenesis and avoidance.* Cleve Clin Q. 1958 ; 25:65-83.

Kone, B. *Localisation and regulation of nitric oxide synthase isoforms in the kidney.* Semin Nephrol. 1999 ; 19:230-41.

Komozi K, Vanhoutte PM. *Endothelium-derived hyperpolarizing factor.* Blood Vessels. 1990 ; 27:238-45.

Kukovetz WK, Holtzmann S, Wurm A, Pösch G. *Prostacyclin increases cAMP in porcine coronary.* J Cyclic Nucl Res. 1979 ; 5:469-76.

Kukreja RC, Kontos HA, Hess M, Ellis EF. *PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH and NADPH.* Circ Res. 1986 ; 59:612-9.

Küng CF, Lüscher TF. *Different mechanisms of endothelial dysfunction with aging and hypertension in rat aorta.* Hypertension. 1995 ; 25:194-200.

Küng CF, Tschudi MR, Noll G, Clozel JP, Lüscher TF. *Effects of the calcium-antagonist mibefradil in epicardial and intramyocardial coronary arteries.* J Cardiovasc Pharmacol. 1995 ; 26:312-8.

Lamarche Y, Gagnon J, Malo O, Blaise G, Carrier M, Perrault LP. *Ventilation prevents pulmonary endothelial dysfunction and improves oxygenation after cardiopulmonary bypass without aortic cross-clamping.* Eur J Cardiothorac Surg. 2004, Sep ; 26(3):554-63.

Lamarche Y, Malo O, Thorin E, Denault A, Carrier M, Roy J, Perrault LP. *Inhaled but not intravenous milrinone prevents pulmonary endothelial dysfunction after cardiopulmonary bypass.* J Thorac Cardiovasc Surg. 2005 ; 130:83-92.

Lassègue B, Griendling KK. *Reactive oxygen species in hypertension.* Am J Hypertens. 2004 ; 17:852-60.

Lee SL, Wang WW, Lanzillo JJ, Fanburg BL. *Serotonin produces both hyperplasia and hypertrophy of bovine pulmonary artery smooth muscle cells in culture.* Am J Physiol. 1994 ; 266:L46-52.

Lee WH Jr, Krumhaar D, Fonkalsrud EW et al. *Denaturation of plasma proteins as a cause of morbidity and death after intracardiac operations.* Surgery. 1961 ; 50:1025.

Lehrer RI, Ganz T. *Biochemistry and function of monocytes and macrophages.* In Beutler E, Coller BS, Lichtman MA et al. Williams Hematology, 6th ed. New York, McGraw-Hill. 2001 ; 865.

Levin ER. *Endothelins.* N Engl J Med. 1995 ; 333:356-63.

Li P, Chappeli MC, Ferrario CM, Brosnihan KB. *Angiotensin-(1-7) augments bradykinin-induced vasodilation by competing with ACE and releasing nitric oxide.* Hypertension. 1997 ; 29:394-400.

Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL. *Oxidized low-density lipoproteins decrease the expression of endothelial nitric oxide synthase.* J Biol Chem. 1995 ; 270:319-24.



Liebold A, Keyl C, Birnbaum DE. *The heart produces but the lungs consume pro-inflammatory cytokines following cardiopulmonary bypass.* Eur J Cardiothor Surg. 1999 ; 15:340.

Lincoln TM, Komalavilas P, Cornwell TL. *Pleitropic regulation of vascular smooth muscle tone by cyclic GMP-dependant protein kinase.* Hypertension. 1994 ; 23:394-400.

Liu Y, Wang Q, Zhu X et al. *Pulmonary artery perfusion with protective solution reduces lung injury after cardiopulmonary bypass.* Ann Thorac Surg. 2000 ; 69:1402-7.

LloydJ, Newman J, BrighamK. *Permeability pulmonary oedema : diagnostic and management.* Arch Intern Med. 1984 ; 144:143.

Lobato EB, Florete O Jr, Bingham HL. *A single dose of milrinone facilitates separation from cardiopulmonary bypass in patients with pre-existing left ventricular dysfunction.* Br J Anaesth. 1998 ; 81:782-4.

Loeckinger A, Kleinsasser A, Lindner K et al. *Continuous positive airway pressure at 10 cm H<sub>2</sub>O during cardiopulmonary bypass improves postoperative gas exchange.* Anesth Analg. 2000 ; 91:522-7.

Lüscher TM, Barton M. *Biology of the endothelium.* Clin Cardiol. 1997 ; 20(11 Suppl 2):II3-10.

Lüscher TF, Vanhoutte PM. *Endothelium-dependant contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat.* Hypertension. 1986 ; 8:344-8.

Lüscher TF, Vanhoutte PM. *The endothelium : modulator of cardiovascular function.* CRC Press, Inc., Boca Raton. 1990 : 1-228.

Lüscher TF, Vanhoutte PM. *Dysfunction of the release of endothelium-derived relaxing factor. Endothelial cell dysfunction.* Edited by Simionescu N, Simionescu M. Plenum Press New York, NY. 1992 ; 65-102.

Maggart M, Stewart S. *The mechanisms and management of non-cardiogenic pulmonary oedema following cardiopulmonary bypass.* Ann Thor Surg. 1987 ; 43:231.

Magnusson L, Zemgulis V, Tenling A et al. *Use of a vital capacity maneuver to prevent atelectasis after CPB.* Anesthesiology. 1998 ; 88:134-42.

Martin W, Villani GM, Jothianandan D, Furchgott RF. *Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta.* J Pharmacol Exp Ther. 1985 ; 232:708-16.

Maruno K, Absood A, Said SI. *VIP inhibits basal and histamine-stimulated proliferation of human airway smooth muscle cells.* Am J Physiol. 1995 ; 268:L1047-51.

Maslow AD, Regan MM, Schwartz C, Bert A, Singh A. *Inotropes improve right heart function in patients undergoing aortic valve replacement for aortic stenosis.* Anesth Analg. 2004 ; 98:891-902.

Mason NA, Springall DR, Burke M et al. *High expression of endothelial nitric oxide synthase in plexiform lesions of pulmonary hypertension.* J Pathol. 1998 ; 185:313-8.

Maxey TS, Smith CD, Kern JA et al. *Beneficial effects of inhaled nitric oxide in adult cardiac surgical patients.* Ann Thorac Surg. 2002 ; 73:529-33.

McLaughlin VV, Rich S. *Pulmonary hypertension.* Curr Prob Cardiol. 2004 ; 29:575-634.

McGafferty DM. *Peroxynitrite and inflammatory bowel disease.* Gut. 2000 ; 46:436-9.

McGowan FX, del Nido PJ, Kurland G et al. *Cardiopulmonary bypass significantly impairs surfactant activity in children.* J Thorac Cardiovasc Surg. 1993 ; 106:968.

McGuire JJ, Ding H, Triggle CR. *Endothelium-derived relaxing factors. A focus on endothelium-derived hyperpolarizing factor(s).* Can J Physiol Pharmacol. 2001 ; 79:443-70.

McQuillan LP, Leung GK, Marsden PA, Kostyk SK, Kourembanas S. *Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanisms.* Am J Physiol. 1994 ; 267:H1921-27.

Michelakis E, Tymchak W, Lien D et al. *Oral sildenafil is an effective and specific pulmonary vasodilator in patients with pulmonary arterial hypertension : comparison with inhaled nitric oxide.* Circulation. 2002 ; 105(20):2398-403.

Milstien S, Katusic Z. *Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrites : implication of vascular endothelial function.* Biochem Biophys Res Comm. 1999 ; 263:681-4.

Mitchell SJ, Wilcox T, Gorman DF. *Bubble generation and venous air filtration by hard-shell venous reservoirs : a comparative study.* Perfusion. 1997 ; 12:325.

Moen O, Fosse E, Broten J et al. *Difference in blood activation related to roller/centrifugal pumps and heparin coated/uncoated surfaces in a cardiopulmonary bypass model circuit.* Perfusion. 1996 ; 11:113.

Mohazzab HKM, Kaminski PM, Wolin MS. *NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium.* Am J Physiol. 1994 ; 266(Heart Circ Physiol 6):H2568-72.

Mombouli JV, Vanhoutte PM. *Purinergetic endothelium-dependant and -independent contractions in rat aorta.* Hypertension. 1993 ; 22:577-83.

Mombouli JV, Vanhoutte PM. *Endothelial dysfunction: from physiology to therapy.* J Mol Cell Cardiol. 1999 ; 31:61-74.

Moncada S, Vane VR. *Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A2 and prostacyclin.* Pharmacol Rev. 1979 ; 30:293-331.

Mora C, Guyton R, Rigatti R et al. *Cardiopulmonary Bypass : Principles and techniques of extracorporeal circulation.* New York : Springer-Verlag. 1995.

Morita K, Ihnken K, Buckberg GD et al. *Pulmonary vasoconstriction due to impaired nitric oxide production after cardiopulmonary bypass.* Ann Thorac Surg. 1996 ; 61:1775-80.

Naftilan AJ. *Role of the tissue rennin-angiotensin system in vascular remodeling and smooth muscle cell growth.* Curr Opin Nephrol Hypertens. 1994 ; 3:218-27.

Nagao T, Illiano S, Vanhoutte PM. *Heterogeneous distribution of endothelium-dependent relaxations resistant to nitro-L-arginine in the arterial tree of the rat.* Am J Physiol. 1992 ; 263:90-4.

Nakashima M, Vanhoutte PM. *Age-dependant decrease in endothelium-dependant hyperpolarizations to endothelin-3 in the rat mesenteric artery.* J Cardiovasc Res. 1993 ; 22(Suppl. 8):S352-4.

Neuhof C, Wendling J, Friedhelm D et al. *Endotoxemia and cytokine generation in cardiac surgery in relation to flow mode and duration of cardiopulmonary bypass.* Shock. 2001 ; 16:39.

Nicholls MG, Lainchbury JG, Lewis LK et al. *Bioactivity of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide in man.* Peptides. 2001 ; 22:1745-52.

Nyhan D, Gaine S, Hales M et al. *Pulmonary vascular endothelial responses are differentially modulated after cardiopulmonary bypass.* J Cardiovasc Pharmacol. 1999 ; 34:518-25.

Okano Y, Yoshioka T, Shimouchi A, Satoh T, Kunieda T. *Orally active protacyclin analogue in primary pulmonary hypertension.* Lancet. 1997 ; 349:1365.

Pagano PJ, Clark JK, Cifuentes-Pagano ME, Clark SM, Callis GM, Quinn MT. *Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia : enhancement by angiotensin II.* Proc Natl Acad Sc USA. 1997 ; 94:14483-8.

Oster JB, Sladen RN, Berkowitz DE. *Cardiopulmonary bypass and the lung.* In Gravlee GP, Davis RF, Kurusz M, Utley JR (eds). *Cardiopulmonary bypass : Principles and Practice.* Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. 2000 ; 367.

Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. *Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine.* Nature. 1998; 333:664-6.

Parsaee H, Mc Ewan JR, Sunil J, MacDermot J. *Differential sensitivities of the prostacyclin and nitric oxide biosynthetic pathways to cytosolic calcium in bovine aortic endothelium cells.* Br J Pharmacol. 1992 ; 107:1013-9.

Pearson DT. *Micro-emboli : gaseous and particulate*, in Taylor KM (ed.) : Cardiopulmonary bypass : Principles and Management. Baltimore, Williams and Wilkins. 1986 ; p.313.

Petkov V, Mosgoeller W, Ziesche R et al. *Vasoactive intestinal peptide as a new drug for treatment of primary pulmonary hypertension*. J Clin Invest. 2003 ; 111:1339-46.

Pueyo ME, Arnal JF, Rami J, Michel JB. *Angiotensin II stimulates the production of NO and peroxynitrites in endothelial cells*. Am J Physiol. Cell Cell Physiol. 1998 ; 274(43):C214-20.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. *The anti-aggregating properties of vascular endothelium : interactions between prostacyclin and nitric oxide*. Br J Pharmacol. 1987 ; 92:639-46.

Raja SG, Nayak SH. *Sildenafil : emerging cardiovascular indications*. Ann Thorac Surg. 2004 ; 78 (4):1496-506.

Rapoport RM, Murad F. *Agonist-induced endothelium-dependant relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP*. Circ Res. 1983 ; 52:352-7.

Ratych R, Chuknyiska R, Bulkley G. *The primary localization of free radical generation after anoxia/reoxygenation in isolated endothelial cells*. Surgery. 1987 ; 102:122-131.

Reichenspurner H, Navia JA, Benny G et al. *Particulate embolic capture by intra-aortic filter device during cardiac surgery*. J Thorac Cardiovasc Surg. 2000 ; 119:233.

Ribalet B, Ciani S, Eddlestone GT. *ATP mediates both activation and inhibition of K(ATP) channel activity via cAMP-dependent protein kinase in insulin-secreting cell lines*. J Gen Physiol. 1989 ; 94(4):693-717.

Rich S, Kaufmann E, Levy PS. *The effect of high doses of calcium-channel blockers on survival in primary pulmonary hypertension*. N Engl J Med. 1992 ; 327:76-81.

Richter JA, Meisner H, Tassani P et al. *Drew-Anderson technique attenuates systemic inflammatory response syndrome and improves respiratory function after coronary artery bypass grafting*. Ann Thorac Surg. 2000 ; 69(1):77-83.

Rinder CS, Bonan JL, Rinder HM et al. *Cardiopulmonary bypass induces leukocyte-platelet adhesion*. *Blood*. 1992 ; 79:1201.

Rinder CS, Rinder HM, Smith BR et al. *Blockade of C5a and C5b-9 generation inhibits leukocyte and platelet activation during extracorporeal circulation*. *J Clin Invest*. 1995 ; 96:1564.

Rinder CS, Rinder HM, Smith MJ et al. *Selective blockade of membrane attack complex formation during simulated extracorporeal circulation inhibits platelets but not leukocyte activation*. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1999 ; 118:460.

Robitaille A, Denault AY, Couture P, Belisle S, Fortier A, Guertin MC, Carrier M, Martineau R. *Importance of relative pulmonary hypertension in cardiac surgery : the mean systemic-to-pulmonary artery pressure ratio*. *J cardiothoracic and vascular anesthesia*. 2006 ; 20:331-9.

Ronson RS, Nakamura M, Vinten-Johanson J. *The cardiovascular effects and implications of peroxynitrites*. *Cardiovasc Res*. 1999 ; 44:47-59.

Ross R. *The pathogenesis of atherosclerosis — an update*. *N Engl J Med*. 1986 ; 314 :488-500.

Royston D, Fleming JS, Desai JB et al. *Increased production of peroxidation products associated with cardiac operations*. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1986 ; 91:759.

Rubanyi GM. *The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases*. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1993 ; 22 (Suppl 4):S1-14.

Rubanyi GM, Vanhoutte PM. *Hypoxia releases a vasoconstrictor substance from the canine vascular endothelium*. *J Physiol*. 1985 ; 364:45-56.

Rubin LJ. *Primary pulmonary hypertension*. *N Engl J Med*. 1997 ; 336:111-7.

Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ et al. *Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension*. *New Engl J Med*. 2002 ; 346:896-903.

Rubin LJ, Barst RJ, Kaiser LR et al. *Primary pulmonary hypertension*. *ACCP Consensus Report*. *Chest*. 1993 ; 104:236.

Rueckschloss U, Quinn MT, Holtz J, Morawietz H. *Dose-dependant regulation of NAD(P)H oxidase expression by angiotensin II in human endothelial cells : protective effect of angiotensin II type I receptor blockade in patients with coronary artery disease.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002 ; 22:1845-51.

Ruschitzka FT, Noll G, Lüscher TF. *The endothelium in coronary artery disease.* Cardiology. 1997 ; 88 (Suppl 3):3-19.

Sablitzki A, Starzmann W, Scheubel R, Grond S, Czeslick EG. *Selective pulmonary vasodilation with inhaled aerosolized milrinone in heart transplant recipient.* Can J Anaesth. 2005 ; 52:1076-82.

Sadow SL. *Factors, fiction and endothelium-derived hyperpolarizing factor.* Clin Exp Pharmacol Physiol. 2004 ; 31:563-70.

Sato K, Jianyi L, Metais C et al. *Increased pulmonary vascular contraction to serotonin after cardiopulmonary bypass : role of cyclooxygenase.* J Surg Research. 2000 ; 90:138-43.

Schapiro M, Despland E, Scott RF et al. *Purified plasma kallikrein aggregates human blood neutrophils.* J Clin Invest. 1982 ; 69:1199.

Schiffrin EL. *Reactivity of small blood vessels in hypertension : relation with structural changes.* Hypertension. 1992 ; 19 (Suppl. II):II1-9.

Schiffrin EL. *The endothelium and the control of blood vessel function in health and disease.* Clin Invest Med. 1994 ; 17:602-20.

Schindo T, Ikeda U, Ohkawa F, Takahashi M, Funayama H, Nishinaga M, Yokoyama M, Kasahara T, Shimada K. *Nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes and fibroblasts.* Life Sci. 1994 ; 55:1101-8.

Schulz R, Nava E, Moncada S. *Induction and potential biological relevance of  $Ca^{2+}$ -independent nitric oxide synthase in the myocardium.* Br J Pharmacol. 1992 ; 105:575-80.

Scott-Burden T, Vanhoutte PM. *The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation*. Circulation. 1993 ; 87 (Suppl V):V51-5.

Scott-Burden T, Vanhoutte PM. *Regulation of smooth muscle cell growth by endothelium-derived factors*. Texas Heart Ins J. 1994 ; 348:225-46.

Seccombe J, Schaff H. *Coronary artery endothelial function after myocardial ischemia and reperfusion*. Ann Thorac Surg. 1995 ; 60:778-88.

Serraf A, Hassan S, Philippe H et al. *Vascular endothelium viability and function after total cardiopulmonary bypass in neonatal piglets*. Am J Respir Crit Care Med. 1999 ; 159:544-51.

Serraf A, Robotin M, Bonnet N et al. *Alteration of the neonatal pulmonary physiology after total cardiopulmonary bypass*. J Thorac Cardiovasc Surg. 1997 ; 114(6):1061-9.

Seyedi N, Xu X, Nasjletti A, Hintze TH. *Coronary kinin generation mediates nitric oxide release after angiotensin receptor stimulation*. Hypertension. 1995 ; 26:164-70.

Shah AM, MacCarthy PA. *Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function*. Pharmacology and therapeutics. 2000 ; 86:49-86.

Shekerdemian LS, Ravn HB, Penny DJ. *Intravenous sildenafil lowers pulmonary vascular resistance in a model of neonatal pulmonary hypertension*. Am J Respir Crit Care Med. 2002 ; 165(8):1098-102.

Shibano TJ, Godina L, Birnbaumer L et al. *Pertussis toxin-sensitive G-proteins in regenerated endothelial cells after balloon denudation in porcine coronary arteries*. Am J Physiol. 1994 ; 267:979-81.

Shibata T, Suehiro S, Sasaki Y, Hosono M, Nishi S, Kinoshita H. *Slow induction of milrinone after coronary artery bypass grafting*. Ann Thorac Cardiovasc Surg. 2001 ; 7:23-7.

Shimokawa H. *Primary endothelial dysfunction : atherosclerosis*. J Mol Cell Cardiol. 1999 ; 31:23-37.



Shimokawa H, Flavahan NA, Lorenz RR, Vanhoutte PM. *Prostacyclin releases endothelium-derived relaxing factor and potentiates its action in coronary arteries of the pig.* Br J Pharmacol. 1988 ; 95:1197-1203.

Shi Y, Niculescu R, Wang D, Patel S, Davenpeck KL, Zalewski A. *Increased NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species in coronary arteries after balloon injury.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001 ; 21:739-45.

Simonneau G, Barst RJ, Galiè N et al. *Continuous subcutaneous infusion of treprostinil, a prostacyclin analogue, in patient with pulmonary arterial hypertension : a double-blind randomized controlled trial.* Am J Respir Crit Care Med. 2002 ; 165:800-4.

Siragy HM. *The role of the AT2 receptor in hypertension.* Am J Hypertens. 2000 ; 13:62S-7.

Sitbon O, Humbert M, Ioos V et al. *Who benefits from long-term calcium-channel blocker therapy in primary pulmonary hypertension.* Am J Respir Crit Care Med. 2003 ; 167:A440. abstract.

Sitbon O, Humbert M, Jagot JL et al. *Inhaled nitric oxide as a screening agent for safely identifying responders to oral calcium-channel blockers in primary pulmonary hypertension.* Eur Respir J. 1998 ; 12:265-70.

Sitbon O, Humbert M, Nunes H et al. *Long-term intravenous epoprostenol infusion in primary pulmonary hypertension : prognostic factors and survival.* J Am Coll Cardiol. 2002 ; 40:780-8.

Skeggs LT, Lentz KE, Gould AB, Hochstrasser H, Kahn Jr. *Biochemistry and kinetics of the rennin-angiotensin system.* Fed Proc. 1967 ; 26:42-7.

Smith JA, Radomski MW, Schulz R, Moncada S, Lewis MJ. *Porcine ventricular endocardial cells in culture express the inducible form of nitric oxide synthase.* Br J Pharmacol. 1993; 108:1107-10.

Smolen JE, Boxer LA. *Functions of neutrophils.* In Beutler E, Coller BS, Lichtman MA et al. Williams Hematology, 6th ed, New York, McGraw-Hill. 2001 ; 761.

Soderman C, Eriksson LS, Juhlin-Dannfelt A, Lundberg JM, Broman L, Holmgren A. *Effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on pulmonary ventilation-perfusion relationships and central haemodynamics in healthy subjects.* Clin Physiol. 1993 ; 13:677-85.

Solina A, Papp D, Ginsberg S, Krause T, Grubb W, Scholz P, Pena LL, Cody R. *A comparison of inhaled nitric oxide and milrinone for the treatment of pulmonary hypertension in adult cardiac surgery patients.* J Cardiothorac Vasc Anesth. 2000 ; 14:12-7.

Spanier T, Oz M, Levin H, Weinberg A et al. *Activation of coagulation and fibrinolytic pathways in patient with left ventricular assist devices.* J Thorac Cardiovasc Surg. 1996 ; 112:1090.

Squadrito GL, Pryor WA. *The nature of reactive species in systems that produce peroxynitrites.* Chem Res Toxicol. 1998 ; 11:718-9.

Stevens LM, El-Hamamsy I, Aubin MC et al. *Effect of tetrahydrobioptérine on selective endothelial dysfunction of epicardial porcine coronary arteries induced by cardiopulmonary bypass.* Eur J Cardiothorac Surg. 2006, Sep ; 30(3):464-71.

Tamari Y, Lee-Sensiba K, Leonard EF et al. *The effects of pressure and flow on hemolysis caused by Bio-Medics centrifugal pumps and roller pumps : guidelines for choosing a blood pump.* J Thorac Cardiovas Surg. 1993 ; 106:997.

Tonz M, Mihaljevic T, von Segesser LK et al. *Acute lung injury during cardiopulmonary bypass : are the neutrophils responsible?* Chest. 1995 ; 108:1551.

Touyz RM, Schiffrin EL. *Ang-II stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells.* Hypertension. 1999 ; 34:976-82.

Touyz RM, Schiffrin EL. *Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells.* Pharmacol Rev. 2000 ; 52:639-72.

Tsutsui M, Shimokawa H, Tanaka S, Kuwoaka I, Hase K, Nogami K, Nakanishi K, Okamatsu S. *Endothelial Gi protein in human coronary arteries.* Eur Heart J. 1994 ; 15:1216-6.

Tuder RM, Cool CD, Geraci MW et al. *Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension.* Am J Respir Crit Care Med. 1999 ; 159:1925-32.

Ursell PC et M Mayes. *Anatomic distribution of nitric oxide synthase in the heart.* Int J Cardiol. 1995 ; 50:217-23.

Vachiéry JL, Hill N, Zwicke D, Barst R, Blackburn s, Naeije R. *Transitionning from intravenous epoprostenol to subcutaneous treprostinil in pulmonary arterial hypertension.* Chest. 2002 ; 121:1561-5.

Vanhoutte PM. *The endothelium – modulator of vascular smooth-muscle tone.* New Engl J Med. 1988 ; 319(August 25):512-3.

Vanhoutte PM. *State of the art lecture : endothelium and control of vascular function.* Hypertension. 1989 ; 13(6, part 2):658-67.

Vanhoutte PM. *Hypercholesterolaemia, atherosclerosis and release of endothelium-derived relaxing factor by aggregating platelets.* Eur Heart J. 1991 ; 12(Suppl E):25-32.

Vanhoutte PM. *The other endothelium-derived vasoactive factors.* Circulation. 1993 ; 87(Suppl V):V9-17.

Vanhoutte PM. *Endothelium-dependant responses in congestive heart failure.* J Mol Cell Cardiol. 1996 ; 28(11):2233-40.

Vanhoutte PM. *Endothelial dysfunction in hypertension.* J Hypertens. 1996<sup>1</sup> ; 14 (Suppl. 5):S83-S93.

Vanhoutte PM, Boulanger CM. *Endothelium-dependant responses in hypertension.* Hypertension Research – Clinical and experimental-. 1995 ; 18:87-98.

Vanhoutte PM, Boulanger CM, Mombouli JV. *Endothelium-derived relaxing factors and converting enzyme inhibition.* Am J Cardiol. 1995 ; 76:3E-12E.

Vanhoutte PM, Gräser T, Lüscher TF. *Endothelium-derived contracting factors*. Endothelin, Ed Gabor Rubanyi, Oxford University Press, Oxford. 1992 : 3-16.

Vanhoutte PM, Perrault LP, Vilaine JP. *Endothelial dysfunction and vascular disease*. Endothelium in Clinical Practice. 1997; Rubany GM, Dzau VM (eds). Marcel Dekker Inc Publ, USA, pp 265-90.

Vanhoutte PM, Rubanyi GM, Miller VM, Houston DS. *Modulation of vascular smooth muscle contraction by the endothelium*. Ann Rev Physiol. 1986 ; 48:307-20.

Vanhoutte PM, Scott-Burden T. *The endothelium in health and disease*. Texas Heart Ins. J 1994 ; 21(1):62-7.

Vanhoutte PM, Shimokawa H. *Endothelium-derived relaxing factor(s) and coronary vasospasm*. Circulation. 1989 ; 80(1):1-9.

van Oeveren W, Kazatchkine MD, Descamps-Latscha B et al. *Deleterious effects of cardiopulmonary bypass : a prospective study of bubble versus membrane oxygenation*. J Thorac Cardiovasc Surg. 1985 ; 89:888.

Vincent JA, Ross RD, Kassab J, Hsu JM, Pinsky WW. *Relation of elevated plasma endothelin in congenital heart disease to increased pulmonary blood flow*. Am J Cardiol. 1993 ; 71:1204-7.

von Frey M, Gruber M. *Untersuchungen über den stoffwechsel isolierter organe. Ein respirations-apparat für isolierte organe*. Virchows Arch Physiol. 1885 ; 9:519.

Wachtfogel YT, Harpel PC, Edmunds LH Jr, Colman RW. *Formation of C1s-C1-inhibitor, kallikrein-C1-inhibitor and plasmin-alpha 2-plasmin inhibitor complexes during cardiopulmonary bypass*. Blood. 1989 ; 73:468.

Wachtfogel YT, Kucich U, Greenplate J et al. *Human neutrophil degranulation during extracorporeal circulation*. Blood. 1987 ; 69:324.

Wahba A, Philip A, Bauer MF et al. *The blood saving potential of vortex versus roller pump with and without aprotinin*. Perfusion. 1995 ; 10:333.

- Walport MJ. *Complement*. New Eng J Med. 2001 ; 344:1058.
- Wan S, LeClerc JL, Vincent JL. *Inflammatory response to cardiopulmonary bypass: mechanisms involved and possible therapeutic strategies*. Chest. 1997 ; 112:676-92.
- Warren JS, Ward PA. *The inflammatory response*. In Beutler E, Collier BS, Lichtman MA et al. Williams Hematology, 6th ed. New York, McGraw-Hill. 2001; 67.
- Weigert AL, Schini VB, Vanhoutte PM. *Endothelium dependent potentiation of the relaxation of the rat aorta to isoproterenol. Role of the inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase by cyclic GMP*. Life Sciences Advances. 1994 ; 13:45-52.
- Wewers MD. *Cytokines and macrophages*. In Remick DG, Friedland JS (eds) : Cytokines in health and disease. 2<sup>nd</sup> ed. New York, Marcel Dekker. 1997 ; 339.
- White DG, Martin W. *Differential control and calcium-dependent production of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin by pig aortic endothelial cells*. Br J Pharmacol. 1989 ; 97:683-90.
- White CR, Brock TA, Chang LY, Crapo J, Briscoe P, Ku D, Bradley WA, Gianturco SH, Gore J, Freeman BA. *Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis*. Proc Natl Acad Sci. 1994 ; 91(3):1044-8.
- Wright G, Sanderson JM. *Cellular aggregation and trauma in cardiotomy suction system*. Thorax. 1979 ; 34:621.
- Yamada T, Takeda J, Katori N, Tsuzaki K, Ochiai R. *Hemodynamic effects of milrinone during weaning from cardiopulmonary bypass : comparison of patients with a low and high prebypass cardiac index*. J Cardiothorac Vasc Anesth. 2000 ; 14:367-73.
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S. *A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells*. Nature. 1988 ; 322:411-15.
- Zhao L, Mason NA, Morrel NW et al. *Sildenafil inhibits hypoxia-mediated pulmonary hypertension*. Circulation. 2001 ; 104:424-8.

Zou M, Martin C, Ulrich V. *Tyrosine nitration as a mechanism of selective inactivation of prostacyclin synthase by peroxynitrites*. Biol Chem. 1997 ; 378:707-13.

Zou MH, Shi C, Cohen RA. *High glucose via peroxynitrites causes tyrosine nitration and inactivation of prostacyclin synthase that is associated with thromboxane/prostaglandin H(2) receptor-mediated apoptosis and adhesion molecule expression in cultured human aortic endothelial cells*. Diabetes. 2002 ; 51:198-203.

